DE BETEEKENIS VAN DE NEPHELOMETRIE VOOR DE PHYSIOLOGIE EN DE PATHOLOGIE. ::

A. A. WEINBERG.

De Beteekenis van de Nephelometrie voor de Physiologie en de Pathologie.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE GRONINGEN, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. L. H. K. BLEEKER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, TEGEN DE BEDENKINGEN DER FACULTEIT IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 18 MAART 1921, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR,

DOOR

ABRAHAM ALBERT WEINBERG,

ARTS,

GEBOREN TE HAMBURG.

B. JACOBS — 1921 — GRONINGEN.

AAN MIJN OUDERS,

AAN MIJN VROUW.

Het is mij bij het beeindigen van dit proefschrift een welkome gelegenheid, U, Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren, Oud-lector en Docenten der Geneeskundige en Natuurwetenschappelijke Faculteiten, te danken voor het grondige onderwijs, dat ik van U mocht ontvangen.

Bovenal richt zich mijn bijzondere dank tot U, hooggeleerde Hamburger, hooggeachte Promotor. De jaren, gedurende welke ik in Uw voortreffelijk ingericht laboratorium heb gewerkt, zullen mij onvergetelijk blijven. Steeds waart Gij bereid, mij met Uwe rijke kennis en Uwe groote ervaring ter zijde te staan, ook wanneer ik wegens moeielijkheden van meer persoonlijken aard Uwe voorlichting vroeg. Dat Gij het waart, die door Uwe bemoeiïngen mij in staat hebt gesteld, mijn universitaire studiën voort te zetten, zal ik steeds in dankbaarheid gedenken.

Ook U, hooggeleerde Wiersma, geldt mijn diepe erkentelijkheid. Ik stel het op zeer hoogen prijs, dat ik in Uwe kliniek als adsistent heb mogen werkzaam zijn en het voorrecht geniet, mij onder Uwe leiding in de beoefening van de experimenteele psychiatrie en psychologie te mogen bekwamen. Ik zeg U hartelijk dank voor de bijzondere goedheid, welke Gij hebt gehad, door mij toe te staan, gedurende zoo langen tijd voor dit proefschrift te werken.

Ten slotte mijn dank aan allen, in en buiten het Physiologische Laboratorium, die mij behulpzaam zijn geweest, in het bijzonder aan mej. E. van Dam, secretaresse, en aan den heer L. J. H. Brand, chef-instrumentmaker van het Physiologische Laboratorium.

INLEIDING.

Tot voor weinige jaren werden de meeste scheikundige analyses verricht volgens de gravimetrische methode. Men veroorzaakte in de vloeistof, welke men wilde analyseeren, een neerslag van de te bepalen stof, waschte en zuiverde dit en bepaalde vervolgens de hoeveelheid van het verkregen product met behulp van de balans. Hoewel deze methode de meest eenvoudige en exacte scheen, voldeed zij in zeer vele gevallen niet. Behalve dat zij veel tijd kost, vergt zij van den onderzoeker een niet onbelangrijke mate van geoefendheid en geduld, wil men er voor microchemisch onderzoek voldoend nauwkeurige resultaten mede bereiken. Men heeft daarom gezocht naar andere micromethoden, en inderdaad zijn een aantal titrimetrische, colorimetrische en onlangs door HAMBURGER sedimetrische bepalingswijzen voorgesteld, welke een groote vooruitgang in de methodiek beteekenen. Sinds het onderzoek naar de scheikundige samenstelling van plantaardige en dierlijke weefsels en vochten een voorname plaats heeft ingenomen in het physiologisch en pathologisch onderzoek, wordt steeds meer de behoefte gevoeld aan het bezit van nauwkeurige, snelle werkwijzen, welke den onderzoeker in staat stellen, zeer geringe hoeveelheden stof quantitatief te bepalen.

Speciaal één methode, de *nephelometrie*, heeft in de laatste jaren een groote vlucht genomen. De nephelometrie (ν ε φ έ λ η = wolk) berust op het principe, uit de mate van troebeling eener vloeistof te besluiten tot het gehalte aan troebelmakende stof, gelijk men met behulp van de *colorimetrie* uit de kleur van de vloeistof opmaakt, hoeveel kleurende substantie de oplossing bevat.

Het is deze nephelometrische methode, waarmee wij ons hebben bezig gehouden. Het uitgangspunt tot onze onderzoekingen was de wensch, om de beweging van het phosphorzuur tusschen cellen en haar natuurlijke omgeving te onderzoeken, wat ook uit een klinisch oogpunt van belang geacht moest worden. Dit plan vormde een voortzetting van het onderzoek naar de bewegingen van Cl en SO_4, in de laatste tijden in het Physiologische Laboratorium alhier verricht.

Daar er, toen wij eenige jaren geleden dit onderzoek aanvingen, voor de microchemische bepaling van phosphoszuur geen andere dan de nephelometrische methode bestond, waren wij genoodzaakt, het hiervoor aangegeven apparaat te bouwen. Tengevolge van den Europeeschen oorlog was het ons echter niet mogelijk, behoorlijk gekitte proefbuizen te verkrijgen, en zoo besloten wij, het principe van de door HAMBURGER voorgestelde sedimetrische methode toe te passen op de microchemische bepaling van $P_2 O_5$ met behulp van het strychninemolybdeenzuurreagens. Deze sedimetrische methode bestaat in de meting van het volumen van het precipitaat, dat in de te onderzoeken vloeistof wordt teweeggebracht, in capillaire buisjes, waarvan iedere verdeeling overeenkomt met 0,0002 of 0,0004 cM^3. Gedurende langen tijd verrichte proeven, welke aanvankelijk succes hadden gehad, moesten echter worden opgegeven bij gebrek aan chemisch zuivere reagentia.

Wij hebben ons daarom, zoodra wij in het bezit waren gekomen van behoorlijke proefbuizen, toegelegd op de bestudeering van de nephelometrische methodiek, wat ons zoowel uit een zuiver physiologisch als uit klinisch oogpunt uiterst gewenscht voorkwam. Sinds toch de microchemische bepalingswijzen van suiker, stikstof, chloor en andere stoffen onze diagnostische en therapeutische kennis zeer belangrijk hebben uitgebreid, is elke nieuwe methodiek, welke door betrouwbare onderzoekers naar voren is gebracht, met belangstelling te begroeten. Dit is dan ook de reden, dat wij het niet overbodig achtten, den nephelometer aan een uitvoerige bespreking te onderwerpen, enkele wijzigingen in de nephelometrische methodiek voor te stellen en hieraan eenige opmerkingen over de toepassing van de nephelometrie in laboratorium en kliniek vast te knoopen.

Een en ander vormt den inhoud van dit proefschrift.

HOOFDSTUK I.

Geschiedenis der Nephelometrie.

Voorloopers der Nephelometrie.

De eerste pogingen, om uit de troebeling van een vloeistof te besluiten tot de aanwezigheid van troebelmakende stof, zijn verricht door MULDER [1]) in 1859. Deze onderzocht zilverchlorideoplossingen op opalescentieverschijnselen in diffuus licht, door twee buisjes eenvoudig in de hand te houden en aldus met elkaar te vergelijken. Het was slechts een qualitatieve, geen quantitatieve methode.

STAS [2]) gebruikte reeds den graad van troebeling eener suspensie als een maat voor de hoeveelheid gesuspendeerde stof. Hij vervaardigde een eenvoudig toestelletje in den vorm van een klein kastje, waarin een aantal glazen buizen met absoluut platte bodems konden worden geplaatst op een plankje, waarin openingen waren aangebracht, welke iets kleiner waren dan de bodems van de er boven staande proefbuizen. Onder dit plankje was een verlichte schaal aangebracht. STAS besloot tot gelijk gehalte aan vaste substantie, wanneer de merken op de schaal onder de buizen bij bezichtiging door verschillend hooge kolommen vloeistof gelijke helderheid vertoonden.

KONIG [3]) liet door de firma A. KRÜSS in Hamburg een toestel bouwen, dat diende voor het bepalen van de doorzichtigheid van troebele vloeistoffen, zooals door den naam „diaphanometer" wordt aangegeven. Het toestel is het best te vergelijken met een colorimeter van DUBOSCQ; de dompelaars zijn op en neer te bewegen; rookglazen dienen als maat voor de hoeveelheid doorgelaten licht; KONIG en KRÜSS [4]) gaven echter zelve reeds eenige gebreken van het toestel aan, o.a. dat zeer zwakke troebelingen naar verhouding veel minder licht doorlieten dan sterkere.

Volgens deze methoden wordt dus de hoeveelheid doorvallend licht bepaald; de eerste, die niet het doorvallende, maar het

---

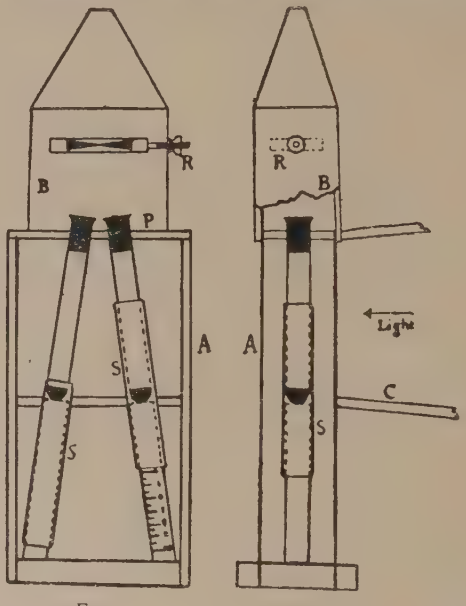
[1]) Mulder, Die Silberprobiermethode. Trans. Grimm, Leipzig 1859.
[2]) Stas, Oeuvres I, 155, 1894.
[3]) J. König, Z. f. Untersuch. d. Nahr. u. Genuszmittel 7, 129, 1904.
[4]) J. König en H. Krüss, ibidem 7, 587, 1904.

loodrecht op den lichtkegel weerkaatste licht, het zoogenaamde „Tyndall-licht" mat, was TSWETT [1]). In het door hem vervaardigde toestelletje werd een lichtbundel op den convexen bodem van een vertikaal geplaatste proefbuis geworpen, en de lichtkegel, welke in de vloeistof ontstond, wanneer deze vaste deeltjes bevatte, van ter zijde door een oculair bekeken.

Nephelometers van Richards en Wells.

De eerste eigenlijke nephelometer is vervaardigd door den Amerikaanschen onderzoeker TH. W. RICHARDS [2]) in 1894 (fig. 1). Deze maakte van het door hem beschreven toestel gebruik voor het bepalen van het atoomgewicht van strontium. In een kastje

Fig. 1.
Nephelometer van Richards 1894.



Front. Side.

Fig. 2.
Nephelometer van Richards en Wells 1904.

plaatste hij twee reageerbuizen nagenoeg vertikaal, doch zoodanig naar elkaar toegeneigd, dat men van boven af tegelijk in beide buizen kon kijken. Om de reageerbuizen waren ondoorzichtige hulzen aangebracht, die heen en weer konden glijden, zoodat de buizen over een willekeurige lengte konden worden belicht.

[1]) M. Tswett, Z. f. physik. Chem. *36*, 450, 1901.
[2]) Th. W. Richards, Proc. Am. Acad. *30*, 385, 1894.

Bij gelijk sterke opalescentie (bij van terzijde opvallend licht van bovenaf waargenomen) bleek de hoeveelheid gesuspendeerde vaste stof omgekeerd evenredig met de hoogte van de belichte vloeistofkolom, echter alleen bij vrij sterk verdunde suspensies; bij dichtere suspensies ging deze verhouding niet op. Het toestel vereischte zeer veel behendigheid en een langdurige ervaring, voordat men er betrouwbare resultaten mee kon verkrijgen.

Tezamen met R. C. WELLS beschreef RICHARDS [1]) daarom in 1904 een verbeterd toestel, dat op hetzelfde principe berustte (fig. 2). Ook bij dezen nephelometer stonden de buizen naar elkaar toegericht boven op een houten staaf, waaromheen de ondoorzichtbare, zwart gelakte hulzen konden glijden. De houten staven waren van een verdeeling voorzien, zoodat men onmiddellijk kon aflezen, hoeveel millimeters het belichte gedeelte van de buis lang was. De proefbuizen waren van boven en beneden van een band van zwart asphaltlak voorzien, om een scherpe afgrenzing te hebben van de vloeistofkolom en den invloed van den meniscus en van den bolvormigen bodem uit te schakelen. Het door de gesuspendeerde deeltjes naar boven weerkaatste licht werd door twee naast elkaar geplaatste prisma's zoodanig gebroken, dat een rond gezichtsveld werd gevormd, waarvan de beide helften correspondeerden met de er onder staande proefbuizen. De suspensies werden gedurende het bepalen telkens met een van platina vervaardigd roerschepje geroerd. Ook bij dit toestel was het noodzakelijk, om, ter vermijding van te groote proeffouten, vele aflezingen te verrichten; de gemiddelde proeffout bedroeg dan ± 5 % bij een suspensie van zilverchloride van 1 à 2 milligram per liter,

WELLS [2]) heeft bij zijn studie over de factoren, welke invloed hebben op de vorming van de AgCl-troebeling, deze laatste vergeleken met matglaasjes, die hij op de opening van het — ledige — contrôlebuisje legde.

RICHARDS [3]) echter wijst op de bronnen van fouten, welke de vergelijking met matglazen, die moeilijk steeds in precies dezelfde positie zijn te brengen, oplevert, en stelt als voorwaarden voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten, 1°. dat de te onder-

[1]) Th. W. Richards en R. C. Wells, Am. Chem. J. *31*, 325, 1904.
[2]) R. C. Wells, Am. Chem. J *35*, 99, 1906; ibidem pag. 508.
[3]) Th. W. Richards, Am. Chem. J. *35*, 510, 1906.

zoeken vloeistof op geheel dezelfde wijze als de standaardsuspensie wordt behandeld; 2°. dat de concentraties van de beide vloeistoffen zoo weinig mogelijk verschillen, en 3°. dat alleen dan de nephelometer voor nauwkeurige bepalingen wordt gebruikt, wanneer het neerslag zóó fijn verdeeld is, dat het niet binnen een behoorlijken tijd, bijv. twee tot drie dagen, uitvlokt en daardoor toegankelijk wordt voor gewone quantitatieve bepalingen.

Bloor [1]) bracht in de huls om de te onderzoeken proefbuis een klemschroef aan, wat een goede verbetering bleek. Als proefbuizen nam hij gelijke reageerbuizen. Daar de hoeveelheid gereflecteerd licht niet volkomen evenredig was met de hoogte van de vloeistofkolom en met de hoeveelheid gesuspendeerde stof, bleek het noodzakelijk, den nephelometer te ijken voor verschillende sterkten van de te onderzoeken vloeistof en voor verschillende standaardoplossingen, indien meer dan één werd gebruikt. De bij het ijken verkregen waarden werden op een kurve overgebracht.

Bloor wijst op de noodzakelijkheid, alle physische en chemische factoren, welke van invloed zijn op de grootte van de deeltjes, constant te houden. Zoo vond hij, dat de te vergelijken vloeistoffen niet te veel in sterkte mogen verschillen, omdat geconcentreerde colloide oplossingen sneller uitvlokken dan meer verdunde.

De gewijzigde colorimeter van Duboscq.

Een belangrijke vooruitgang op het gebied van de nephelometrie is te danken aan Ph. A. Kober [2]). Deze beschreef in 1913 een nieuw instrument, dat op een eenvoudige wijze vervaardigd was uit een colorimeter van Duboscq (fig. 3.).

Hij bestreek de dompelaars van den colorimeter meerdere malen met asphaltlak, terwijl hij den bodem doorzichtig liet. Onder het metalen vlak, waarop de proefbuizen rustten, was met behulp van een paar gummibanden een houten buishouder aangebracht, waarin twee uithollingen waren, om er de buizen in te plaatsen. Tusschen de buizen in was een schermpje aangebracht, om te voorkomen, dat licht uit de eene buis in de

[1]) W. R. Bloor, J. Am. Chem. Soc. *36*, 1300, 1914.
[2]) Ph. A. Kober, J. of Biol. Chem. *13*, 485, 1912-13.

andere zou worden gereflecteerd. Vóór de buizen waren houten schermen aan het toestel bevestigd, welke even ver naar beneden

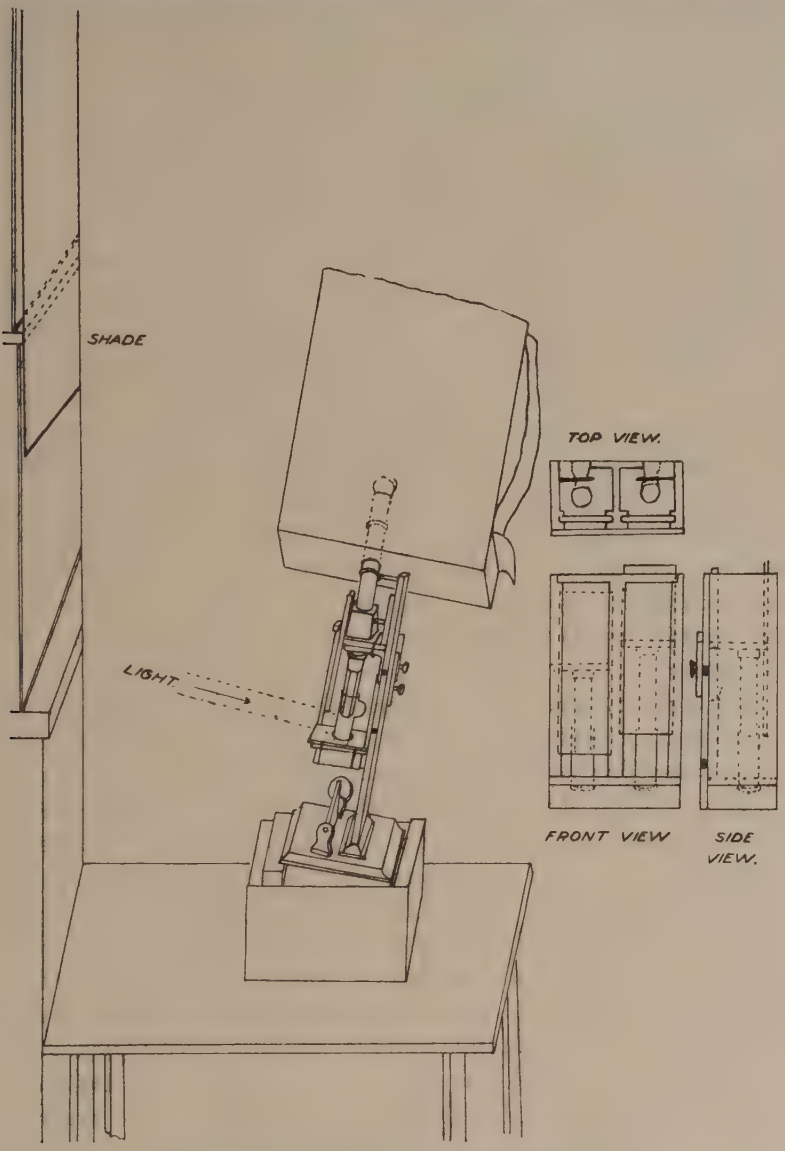


Fig. 3. De gewijzigde Duboscq volgens Kober.

reikten als de dompelaars en daardoor het van de lichtbron komende licht scherp afsneden. Vóór het toestel was een scherm geplaatst met een verstelbare opening, waardoor het voor het

onderzoek benoodigde licht viel. Daglicht voldeed niet zoo goed als een Mazda-lamp van 100 Watt, die op een afstand van ongeveer een halve meter vóór den nephelometer was opgesteld. Het oculair was omgeven door een houten of een papieren doos waarin een opening, groot genoeg om het hoofd door te steken, was aangebracht. Alle houten onderdeelen waren met zwart asphaltlak bestreken.

Dit nieuwe toestel leverde vele voordeelen op boven het oude; de voornaamste waren wel, dat bronnen van fouten tengevolge van den meniscus van de te onderzoeken vloeistof, van de indirecte terugkaatsing van licht door de gesuspendeerde stof in het onderste deel van de buizen, en van de weerkaatsing van licht uit de eene buis in de andere waren buitengesloten. Verder is het nieuwe instrument beter bij daglicht te gebruiken, er is minder vloeistof — ten hoogste 6 c.M^3 — noodig voor een bepaling en er kan met veel minder aflezingen worden volstaan. Het vóór het toestel geplaatste scherm vergemakkelijkt het waarnemen zeer en verhoogt daardoor de nauwkeurigheid der aflezingen. Het toestel staat achterover geneigd, om het onderzoek te vergemakkelijken en om te voorkomen, dat zich luchtbellen vormen bij het brengen van de dompelaars in de vloeistof.

Het bleek Kober aan de hand van proeven, welke hij verrichtte met zilverchloridetroebelingen en met troebelingen, welke hij verkreeg, door edestine uit een zwak zure oplossing neer te slaan met keukenzoutoplossing, dat het instrument niet in constant evenwicht was te krijgen. Bij een hoogte van de standaardsuspensie van 15 m.M. verkreeg hij voor de hoogte van de vergelijkingsvloeistof van dezelfde sterkte telkens verschillende waarden. Kober vergelijkt deze schommelingen met de wisselingen in het nulpunt van een gevoelige balans en schrijft ze toe aan wisselingen in belichting, veranderingen in de optische gesteldheid van het instrument, e.d. Het is dientengevolge niet mogelijk een kurve te teekenen, die de verhouding tusschen de mate van troebeling en de hoogte van de vloeistof weergeeft en die tevens voor alle onderzoekers geldig is. Toch is het maken van een kurve volgens Kober een vereischte, doordat bij dezen nephelometer geen directe, omgekeerde evenredigheid tusschen de hoogte van de vloeistofkolom en de hoeveelheid troebelmakende stof bestaat. De hoeveelheid van deze stof is

steeds iets geringer dan de hypothetische kurve zou aangeven. In nevenstaande kurve (fig. 4) blijkt dit ten duidelijkste. De wisselingen van het nulpunt vorderen echter, dat men telkens opnieuw den nephelometer ijkt en een nieuwe kurve teekent; om dit te vermijden, stelt KOBER een formule op, die men gebruiken kan, wanneer de suspensies niet te veel — macroscopisch niet duidelijk zichtbaar — in sterkte uiteenloopen.

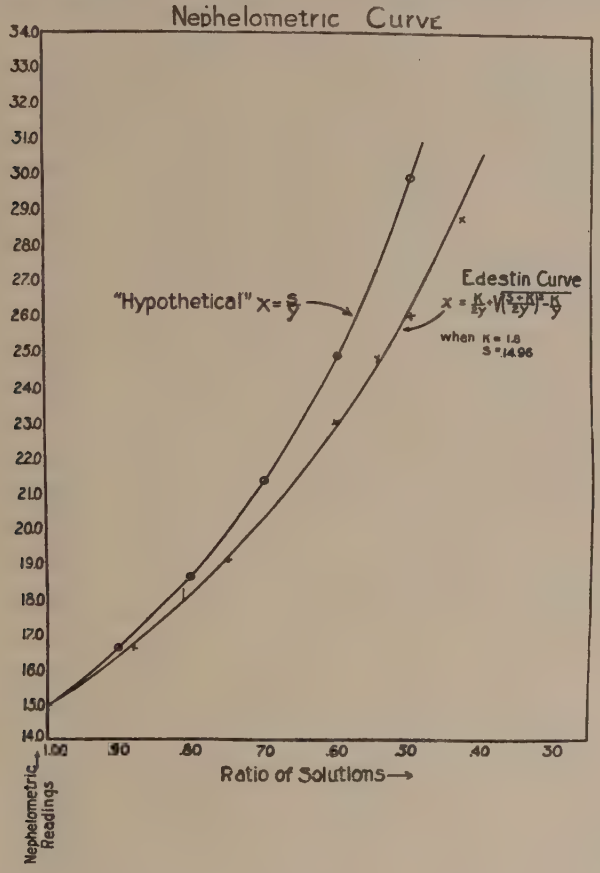


Fig. 4.

Deze formule luidt:

$$y = \frac{s}{x} - \frac{(1 - x)\,K}{x^2}$$

Hierin is y de hoogte van de onbekende suspensie; x de verhouding tusschen de beide suspensies; s de hoogte, welke de standaardoplossing zou aanwijzen, indien deze als vergelijkingsoplossing was bepaald; m.a.w. s geeft het werkelijke nulpunt van het toestel aan. K is een constante, welke men verkrijgt, wanneer

men alle bij het standariseeren van het instrument gevonden waarden invult. K blijkt evenredig te zijn met den factor, die gevonden wordt bij een andere hoogte van de standaardvloeistof; nemen wij $k = \frac{K}{s}$, dan wordt de formule:

$$y = \frac{s}{x} - \frac{s\,(1 - x)\,k}{x^2}$$

Zoodat voor x, uitgedrukt in waarden van y, de formule luidt:

$$x = \frac{s + sk + \sqrt{(s + sk)^2 - 4\,sky}}{2\,y}$$

Bloor[1]) achtte het een nadeel in het toestel van Kober, dat het met gelakte dompelaars werkte, omdat de lak in het algemeen min of meer oplosbaar was in de te onderzoeken vloeistoffen. Hij stelde daarom voor, de voordeelen van het instrument van Richards te verbinden met de betere mechanische uitrusting van den colorimeter van Duboscq. Op de plaats, waar bij den colorimeter de dompelaars bevestigd zijn, bracht hij op een eenvoudige wijze de proefbuizen van den nephelometer aan. Om deze buizen glijden ondoorzichtige metalen of glazen hulzen, welke van onderen zijn afgesloten en in de houders voor de colorimeterproefbuizen zijn bevestigd. Het gedeelte van de proefbuizen, dat boven de met een klemschroef in haar hoogsten stand geplaatste huls uitsteekt, is met zwart papier of zwarte lak van buiten bedekt. De nephelometer is in een doos geplaatst op een constanten afstand van 30 c.M. van een 50 Watt „Mazda-lamp". De doos is van binnen zwart geverfd. Werken in een donkere kamer acht Bloor aanbevelenswaardig, maar niet noodzakelijk.

Ook Bloor komt tot de conclusie, dat het noodzakelijk is, het toestel te ijken[2]) voor verschillende sterkten van de proef- zoowel als van de standaardvloeistoffen. Wanneer de onbekende en de standaardoplossing in sterkte zeer uiteenloopen, dan zijn ze moeilijk met elkaar te vergelijken. Aflezingen beneden 18 m.M. of van $\pm$ 45 m.M. bij een hoogte van den standaard van 30 m.M. kunnen niet als nauwkeurige waarden worden beschouwd.

Meigs[3]) heeft den door Bloor gewijzigde Duboscq onderzocht met behulp van phosphaatoplossingen, welke hij met het molybdeen-

---

[1]) W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *22*, 145, 1915.
[2]) W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *22*, 143, 1915.
[3]) E. B. Meigs, J. of Biol. Chem. *36*, 335, 1918.

strychninereagens van KOBER en EGERER neersloeg. De formule van KOBER en EGERER gaat volgens hem bij deze bepalingen in het algemeen niet op; hij vond, dat verschillende veranderlijke factoren, zooals de temperatuur, de ouderdom, de wijze van bereiden en de zuurgraad van het reagens, van invloed zijn op de resultaten.

De nephelometer-colorimeter van Lenzman-Kober.

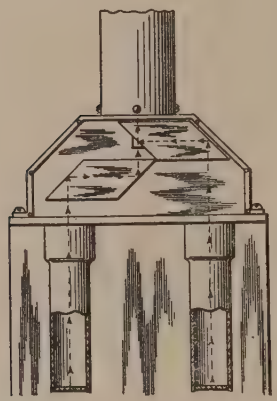
Ten gevolge van den Europeeschen oorlog was het in Amerika niet mogelijk, de Fransche colorimeters van DUBOSCQ te krijgen en daardoor ging KOBER over tot het bouwen van een nieuw instrument met medewerking van de firma LENZ en NAUMANN [1]). Zij volgden daarbij de constructie van den colorimeter van DUBOSCQ. Een der voornaamste verbeteringen was wel de invoering van dompelaars en van proefbuizen, waarvan de bodems aan de zijwanden waren vastgegoten of -gesmolten; bij de dompelaars was de bodem doorzichtig, van optisch zuiver glas, en de cylindrische wand van ondoorzichtig zwart glas; bij de proefbuizen, die van boven verwijd waren, was de cylindrische wand van optisch zuiver glas en de glazen bodem zwart en ondoorzichtig. Dit gaf het belangrijke voordeel, dat men thans alle soorten suspensies kon onderzoeken zonder vrees, dat de kit, waarmee de bodems aan de wanden bevestigd waren, in de vloeistof zou oplossen, en dat de buizen met elk willekeurig reinigingsmiddel konden worden schoongemaakt. Deze verbetering dankte KOBER aan HUGO SCHNACKENBERG.

Andere voordeelen van het gewijzigde instrument zijn: Een paar verstelbare nonii sluiten elke onnauwkeurigheid van het nulpunt uit. Er is geen open ruimte tusschen oculair en suspensie, zoodat geen stof kan binnendringen. De hoogten van het instrument en van de verdeelde schaal laten toe, dat men vloeistofkolommen, welke 110 m.M. hoog zijn, nog kan onderzoeken. Door het gebruik van zwart glas is het bestrijken met asphaltlak overbodig geworden. Men kan het toestel eenvoudig door proefbuizen met doorzichtige bodems en zwarte wanden te nemen, in een colorimeter veranderen. De dompelaars vertoonen, in tegenstelling met zelfs de beste dompelaars van DUBOSCQ geen eigen kleur of lichtabsorptie. Een nieuw gezichtsveld, gelijkend

[1]) Ph. A. Kober en Sara S. Graves, J. of Ind. and Engin. Chem. *7*, 843, 1915.

op dat volgens LUMMER-BRODHUN (een vierkant in een cirkel) maakt, indien het althans op de juiste wijze is aangebracht, het waarnemen gemakkelijker en nauwkeuriger. In fig. 5 is de gang der lichtstralen weergegeven.

Het toestel had echter nog enkele gebreken. In de eerste plaats werd de achtergrond van de opalescente vloeistoffen gevormd door automatisch sluitende gordijnen en verder had



Fig, 5. Gang der lichtstralen in den nephelometer van Lenzman-Kober.

het instrument evenals de colorimeter van DUBOSCQ klemschroeven voor het instellen van de proefbuizen, welke bijna niet zijn te gebruiken, zonder storende fouten te maken.

Een groote vooruitgang in de techniek beteekende het aanbrengen van een passende, vaste lichtbron. Daar deze echter weinig verschilt van die bij het nieuwste instrument, zullen wij de bespreking er van bij de beschrijving van den verbeterden nephelometer voegen.

De nieuwe nephelometer-colorimeter van Kober.

De voornaamste verbetering boven het vorige toestel is wel, dat de proefbuizen niet meer met een klemschroef aan het statief worden bevestigd, maar langs een schroefdraad op en neer worden bewogen [1]). Deze schroefdraad is van boven voor-

[1]) Ph. A. Kober, J. of Biol. Chem. *29*, 155, 1917. Het toestel is vervaardigd door de Klett Manufacturing Co. Inc., New-York.

zien van een dubbelen knop; met het bovenste, smallere deel kan ruw worden ingesteld, terwijl het onderste, breedere deel voor fijnere instelling dient. Door deze inrichting zijn de zwarte gordijnen overbodig geworden. De constructie van het geheel is hierdoor aanmerkelijk vereenvoudigd (fig. 6.)

Een andere verbetering is gelegen in de verdeelde schaal, welke in den nieuwen nephelometer afneembaar is en dus gemakkelijk kan worden hersteld of zoo noodig door een nieuwe vervangen. In de nieuwste uitvoering[1]) is het gezichtsveld volgens LUMMER-BRODHUN vervangen door een in tweeën gedeeld

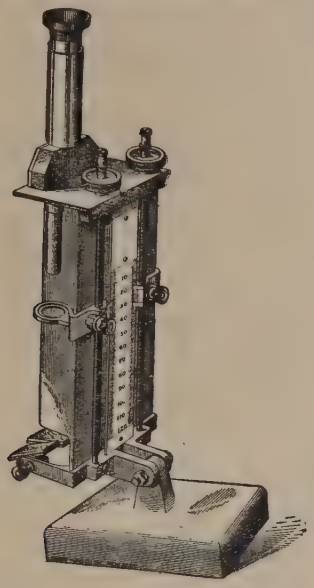


Fig. 6. De nieuwe nephelometer-colorimeter van Kober.

veld, waarvan elke helft overeenkomt met de daaronder staande proefbuis. In het oculair is een klein diaphragma aangebracht met een opening ter grootte van een speldeknop, welke opening juist tegenover het middenpunt van het gezichtsveld gelegen is. Door deze constructie wordt ongelijkmatige helderheid van het gezichtsveld, die bij een grootere opening nogal eens voorkomt tengevolge van oogbewegingen van den onderzoeker, vermeden. Een uitstekende rand om het oculair, waarop de oogkas kan rusten, bevordert eveneens het onbewegelijk houden van het oog.

KOBER stelt verschillende eischen voor de lichtbron van den

[1]) Ph. A. Kober, J. of Ind. and Engin. Chem. *10*, 556, 1918.

nephelometer. De nauwkeurigheid van aflezing is afhankelijk van de gelijkheid en de gelijkmatigheid van het licht, dat op de proefbuizen valt. Terwijl de fouten tengevolge van ongelijke belichting van de beide helften van den nephelometer in de meeste gevallen kunnen worden vermeden door een zorgvuldige opstelling, zijn de fouten tengevolge van veranderingen of ongelijkmatigheden van de lichtsterkte niet te controleeren. Bij een goeden nephelometer mag het gezichtsveld niet verlicht zijn, wanneer er geen suspensie onder de dompelaars is geplaatst; anders gezegd, er mag geen „nullicht" zijn. Teneinde dit nullicht te voorkomen, moet de lichtbron evenwijdige stralen uitzenden.

De theoretische eischen voor een dergelijk licht zijn volgens

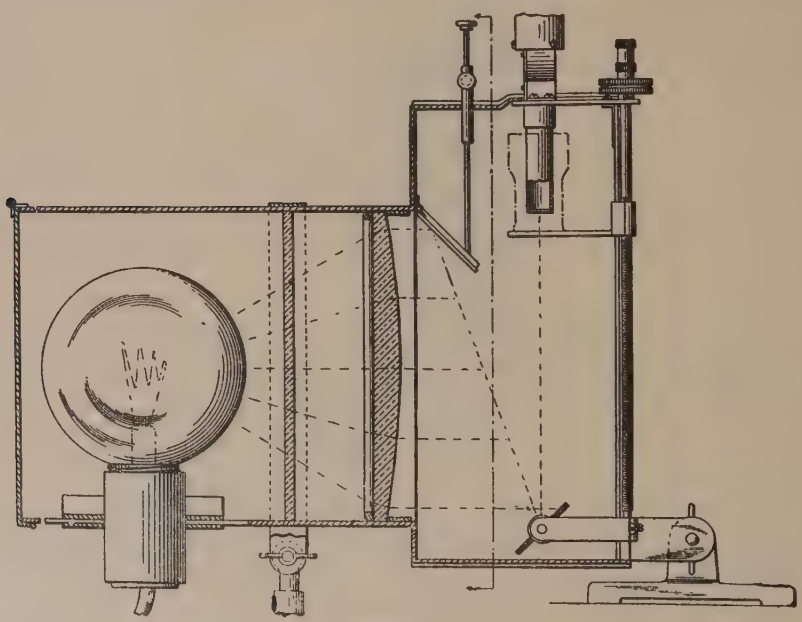


Fig. 7.

KOBER: 1°. een puntvormige lichtbron, die gemakkelijk aan een gewoon stadsnet kan worden aangesloten; 2°. een optisch systeem, om de lichtstralen evenwijdig te maken, wat het eenvoudigste kan geschieden door een Ramsden-oculair.

Daar een booglamp geen gelijkmatig licht uitzendt, nam KOBER voor dit doel een Wolfram-lamp van 110—120 Volt (stereopticon) met een geconcentreerd dradennet, welke door een glasplaat

en een luchtlaag gescheiden was van den condensor, om onnoodig verhitten van condensor en nephelometer tegen te gaan. Deze lichtbron kan aan de meeste stroomnetten worden aangesloten en wordt in een daarvoor geconstrueerde lampekast bevestigd. Het toestel met lampekast moet zoo worden opgesteld, dat van buiten af geen licht waarneembaar is (fig. 7.).

Voor verschillende doeleinden kan echter worden volstaan met een gewone krachtige electrische lamp, die op ongeveer een meter afstand van den nephelometer goed bevestigd wordt opgesteld.

Voor het verkrijgen van goede resultaten is het volgens KOBER een vereischte, in een donkere kamer te werken en niet te veel waarnemingen na elkaar zonder rustpauze te verrichten. Volgt men deze voorschriften niet op, dan is men niet in staat, fijne verschillen waar te nemen, terwijl men in het andere geval dag in dag uit nephelometrische onderzoekingen kan doen zonder inspanning of schade voor de oogen.

Het toestel moet stofvrij worden gehouden en men moet zorg dragen, kleine luchtbellen onder de dompelaars te verwijderen, omdat ook deze het licht weerkaatsen.

Ik wensch op deze plaats Dr. KOBER mijn welgemeenden dank te betuigen voor het welwillend in bruikleen afstaan van de cliché's zijner publicaties.

Nephelometer van Kleinmann en Feigl.

Bij zijn onderzoekingen over microbepalingen van phosphorzuur heeft KLEINMANN onder leiding van FEIGL ook de techniek der nephelometrie bestudeerd [1]). Hij kende het nieuwste toestel van KOBER nog niet, doch slechts diens gewijzigde DUBOSCQ-nephelometer-colorimeter. Hij liet een dergelijk toestel namaken en vond als practische gebreken:

1°. het veelvuldige schommelen van het nulpunt;

2°. de bijzonder geringe lichtgevoeligheid;

3°. het gekit zijn van de dompelaars (gelijk hierboven is vermeld, is dit gebrek in de latere toestellen niet meer aanwezig);

4°. het vormen van schaduwen door de lichtschermen om de dompelaars.

De beide laatste gebreken acht KLEINMANN slechts technische onvolmaaktheden, de beide eerste echter ernstige fouten. De belangrijkste hiervan is wel, dat het apparaat te weinig gevoelig

[1]) H. Kleinmann, Biochem. Z. 99, 115, 1919, Kolloid-Zeitschrift 1920.

is; de bepalingen er mede kunnen volgens hem slechts als schattingen, niet als exacte metingen worden opgevat. Deze onnauwkeurigheid is volgens KLEINMANN dezelfde als bij den colorimeter van DUBOSCQ.

Behalve deze practische gebreken vermeldt KLEINMANN nog gewichtige theoretische bedenkingen tegen de met het instrument uitgevoerde bepalingen.

De eerste eisch, dien hij opstelt, is, dat de buizen zoo loodrecht mogelijk in het midden worden beschenen door evenwijdig licht. Dit laatste is echter moeielijk te verkrijgen en vereischt een gecompliceerd lenzenstelsel. Men zou dus kunnen probeeren, het evenwijdige licht zooveel mogelijk te benaderen, door den afstand van de lichtbron tot den nephelometer in verhouding tot de grootte van de te belichten vlakte zoo groot mogelijk te maken. Aan geen van deze eischen wordt echter bij de bepalingen met den nephelometer van KOBER voldaan.

Een andere bron van fouten is deze, dat op de breking, die het licht door de cylindrische proefbuizen ondergaat, geen acht is geslagen; in de verschillende publicaties is tenminste daarover niets te vinden. Wanneer men van boven in een met een troebele vloeistof gevuld cylinderglas kijkt, ziet men de volgende door de breking van de lichtstralen door het glas veroorzaakte schaduwfiguur (fig. 8).

Fig. 8.

Bij de constructie van een nephelometer moet er dus op worden gelet, dat men alleen licht uit den binnensten cirkel *(a)* meet.

Wanneer echter — aldus KLEINMANN — de bepalingen met het toestel op zichzelf al niet zonder bedenkingen zijn, dan is het een principieele fout, het instrument te onderzoeken met suspensies, wier eigenschappen zelf niet bekend zijn, doordat ze door precipiteeren zijn verkregen, of uit de bepalingen te besluiten tot het wezen van de verhouding tusschen troebeling en concentratie. Want op deze wijze wordt een onbekende met een andere gemeten en men moet zich verzetten tegen een poging, uit dergelijke bepalingen een wiskundige formule af te leiden over de verhouding tusschen troebeling en gehalte aan vaste stof.

Ten einde de fouten in de gewijzigde DUBOSCQ te vermijden, liet KLEINMANN door de firma SCHMIDT en HAENSCH in Berlijn een

nieuwen, hieronder schematisch weergegeven nephelometer bouwen (fig. 9).

a_1, a_2 zijn kleine cylindrische proefbuizen, welke bestaan uit optisch zuiver glas, geheel vrij van strepen. Deze worden van voren (loodrecht op den achterkant van het teekenvlak) belicht en het daarin ontstaande Tyndalllicht van boven bekeken. Dit Tyndalllicht gaat eerst door twee massieve glazen cylinders b_1, en b_2, die, geheel

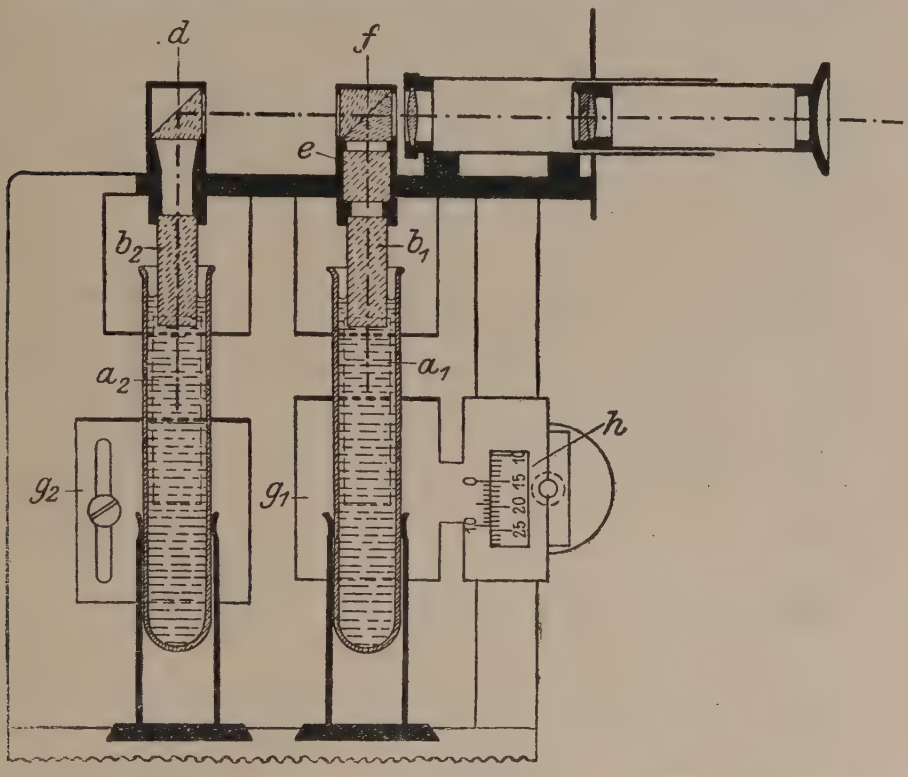


Fig. 9. De nephelometer van Kleinmann en Feigl.

aan elkaar gelijk, achter elkaar uit hetzelfde stuk glas gesneden zijn. Deze zijn behalve aan den boven- en onderkant geheel mat en steken in de vloeistof van de proefbuizen.

Terwijl het licht uit buis a_2 door een prisma d op het prisma van LUMMER-BRODHUN [1]) wordt geworpen, valt het licht van buis a_1 hierin direct, nadat het een klein glazen prisma, dat in lichtabsorptie overeenkomt met prisma d_1 heeft gepasseerd. De door het prisma ontstane concentrisch elliptische gezichtsvelden worden, zooals gewoonlijk, met een oculair bekeken.

[1]) In het laatste model is het gezichtsveld volgens LUMMER-BRODHUN vervangen door een in tweeën gedeeld veld zooals bij den polarimeter.

De hoogten van de aan het licht blootgestelde proefbuizen kunnen willekeurig en meetbaar worden gewijzigd, daar door bewegelijke metalen platen g_1 en g_2 de lengten van de vensters, die in de het toestel frontraal bedekkende metalen plaat zijn gesneden, naar believen veranderd kunnen worden. De bewegelijke metalen platen liggen vlak tegen de buizen aan en zijn scherp afgesneden, zoodat de schaduw, die de lengte van de belichte vloeistofkolom afsnijdt, een uiterst scherpe is. Met behulp van een schroef en een nonius kan tot op 0,1 m.M. nauwkeurig worden ingesteld.

De cylindrische proefbuizen rusten in veerende metalen hulzen, waarin ze gemakkelijk op en neer kunnen worden bewogen. Deze hulzen zijn uitneembaar, doch worden voor het onderzoek op een horizontale plaat bevestigd, waardoor ze onbewegelijk achter de vensters blijven staan. Door de proefbuizen in de hulzen naar boven te schuiven, dompelt men de massieve glazen cylinders b_1 en b_2, die ongeveer 2 m.M. minder ver naar beneden reiken dan de metalen voorwand, in de vloeistof.

Kleinmann gebruikte als lichtbron een Osramlamp van 50 kaarsen, welke vertikaal op dezelfde hoogte als de vensters was opgesteld op een afstand van ± 75 c.M. van het toestel. Lamp en toestel werden, nadat gebleken was, dat beide helften van het instrument gelijkelijk werden belicht, op vaste, op de onderzoektafel gemerkte plaatsen opgesteld.

De lichtgevoeligheid van den nephelometer is volgens Kleinmann bijzonder groot; wijzigingen in de lengte van de vensters van 0,1 m.M. worden zelfs bij relatief zwakke troebelingen waargenomen. Subjectieve factoren spelen hier echter een groote rol; daardoor verkrijgt men na eenige oefening een veel grootere nauwkeurigheid in het aflezen dan in den beginne. Verder acht Kleinmann het beslist noodzakelijk, het oog gedurende eenigen tijd, 5 à 10 minuten, aan de duisternis — er wordt in de donkere kamer gewerkt — te doen gewennen. Maar ook bij een reeks waarnemingen achtereen is het geraden, het oog nu en dan in het donker te laten uitrusten, daar door schommelingen in de gevoeligheid van het oog wisselingen in de nauwkeurigheid der bepalingen kunnen ontstaan. Ten einde de subjectieve fouten uit te schakelen, is het aanbevelenswaardig, elke bepaling circa 10 malen te herhalen, wat snel en gemakkelijk uitvoerbaar is, en het gemiddelde van deze aflezingen te gebruiken.

Kleinmann onderzocht zijn nephelometer met zilverchloride- en glycogeensuspensies en kwam daarbij tot het volgende resultaat:

1°. Het instrument is vrij van evenwichtsschommelingen.

2°. De maximale waarnemingsfout bedraagt ± 1 %, de gemiddelde fout ± 0.5 %[1]).

3°. Het toestel heeft een klein formaat en is gemakkelijk verplaatsbaar; het werken er mede is uiterst eenvoudig.

4°. De aflezingen zijn omgekeerd evenredig met de concentraties van de onderzochte vloeistoffen, wanneer althans de grootte van de gesuspendeerde deeltjes dezelfde is.

Dit laatste punt is vooral van groote beteekenis wegens de enorme vereenvoudiging in werkwijze, welke er het gevolg van is. Bovendien komt dit resultaat overeen met de theoretische verhoudingen, welke bestaan tusschen de sterkte van het Tyndalllicht en de factoren, die het veroorzaken, en welke reeds langer bekend zijn door de werken van Lord RAYLEIGH.

Volgens dezen onderzoeker is de intensiteit I van het Tyndalllicht op een loodrecht op den Tyndallkegel waargenomen plaats direct evenredig met het aantal colloide deeltjes n per ruimteëenheid van de vloeistof, evenredig met de tweede macht van het volumen van de deeltjes v en omgekeerd evenredig met de vierde macht van de golflengte van het licht λ, indien tenminste de grootte van de deeltjes klein is vergeleken bij de golflengte van het licht. In een formule uitgedrukt wordt dit:

$$I = \frac{n\ v^2}{\lambda^4}\ k$$

Voert men de gezamelijke massa der deeltjes per volumeneenheid c, dus haar concentratie, in de formule in, dan is $n\ v\ s = c$, waarin s het soortelijk gewicht van de deeltjes is. Wij krijgen dan voor I:

$$I = \frac{c\ v}{\lambda^4\ s}\ k$$

Indien de diameter van de deeltjes echter ten opzichte van de golflengte van het licht niet klein is, dan luidt volgens CLAUDIUS de formule:

$$I = \frac{c\ v}{\lambda^3\ s}\ k$$

Voor de bepaling van de concentratie wordt echter zoowel bij de formule van CLAUDIUS als bij die van RAYLEIGH de vergelijking, daar k, λ en s voor de bepaling van dezelfde stof bij hetzelfde licht bekend zijn,

$$I = c.\ v.\ k_1,$$

waaruit volgt voor de verhouding van twee verschillende concentraties van dezelfde stof:

$$c : c_1, = I.\ v_1, : I_1.\ v.$$

Wanneer nu in beide oplossingen de grootte van de deeltjes

[1]) Met het nieuwste instrument van KOBER wordt dezelfde graad van nauwkeurigheid verkregen.

dezelfde is, dan volgt uit de formule, dat de intensiteit van het Tyndalllicht recht evenredig is met de concentratie.

Deze vergelijking is echter slechts geldig voor een enkele plaats in het Tyndalllicht, welke theoretisch afzonderlijk wordt waargenomen. In hoeverre het gezamenlijke licht van een Tyndallkegel door weerkaatsing door de deeltjes onderling, door het zwakker worden in de richting van zijn as en door absorptie van het licht van de onderste lagen door de daarboven liggende een afwijkende formule geeft, kan niet zonder meer worden voorspeld, maar moet experimenteel worden vastgesteld. Eveneens moet worden nagegaan, of een eventueele afwijking van de formule binnen de foutengrens blijft van de bepaling, resp. van de methodiek.

Tyndallmeter van Mecklenburg en Valentiner.

Mecklenburg en Valentiner [1]) hebben door de firma Schmidt en Haensch een toestel laten bouwen, om de grootten van de formule van Rayleigh te meten, en in het bijzonder, om de grootte der deeltjes in colloidale oplossingen te bepalen.

Het principe van den Tyndallmeter is het volgende: Een bepaalde plaats van een door evenwijdig licht in een troebele vloeistof ontstane Tyndallkegel wordt in lichtsterkte vergeleken met een lichtbundel, welke door een stel nicols van intensiteit kan worden veranderd.

Volgens Kleinmann [2]) is het toestel uiterst nauwkeurig, maar zeer gecompliceerd; de behandeling is een buitengewoon subtiele en vereischt een langdurige oefening. De moeilijkheden bij het werken met het apparaat vermeerderen, wanneer inplaats van gedeelten van denzelfden kegel verschillende vloeistoffen met elkaar worden vergeleken, zooals immers voor het bepalen van de concentratie noodzakelijk is. Waar bovendien steeds een vrij groot aantal parallelbepalingen moet worden verricht, is het toestel minder geschikt voor het bepalen van de concentraties van verschillende oplossingen, speciaal echter niet geeigend voor het doen van reeksen analytische onderzoekingen.

---

[1]) W. Mecklenburg en S. Valentiner, Z. f. Instrumentenkunde, *34*, 209, 1904; W. Mecklenburg, Kolloid-Z. *14*, 172, 1914.

[2]) H. Kleinmann, Biochem. Z. *99*, 129, 1919.

Spectrophotometer van Kamerlingh Onnes en Keesom.

Reeds eenige jaren vóór MECKLENBURG en VALENTINER hebben KAMERLINGH ONNES en KEESOM [1]) een toestel geconstrueerd, om de opalescentie van stoffen in de nabijheid van den kritischen toestand te onderzoeken. Het toestel berust op hetzelfde principe als het voorgaande, behalve dat de te vergelijken lichtbundels door een rechtziend spectroscoop worden bekeken.

Tyndallmeter van Wilke en Handovsky.

Dit toestel [2]) verschilt in zooverre van dat van MECKLENBURG en VALENTINER, dat het technisch minder volkomen is uitgevoerd.

Nephelometer van Marshall en Banks.

In dezen nephelometer [3]) hebben de beide met elkaar te vergelijken vloeistofkolommen constant dezelfde hoogte; de vervaardigers van het toestel trachten aldus één factor in standaard en vergelijkingsoplossing gelijk te maken. Een „wigvormig, neutraal getint glas", dat boven een van de beide proefbuizen kan worden heen en weergeschoven, geldt als maat voor de onbekende vloeistof. Het toestel is door andere onderzoekers, voor zoover na te gaan, niet gebruikt.

Nephelometer van Chéneveau en Audubert.

Dit toestel [4]) heeft een vasten standaard, bestaande uit een neutraal getint, wigvormig stuk glas, dat als maat voor de sterkte van het Tyndalllicht in de proefbuis geldt. De beide lichtbundels worden met een monochromatisch (groen) glas bekeken. De nauwkeurigheid van het toestel is 2 tot 5 %, dus geringer dan die van de nephelometers van KOBER en van KLEINMANN.

Microcolorimeter en nephelometer van Baudouin en Bénard.

De microcolorimeter [5]) is een verkleinde colorimeter van DUBOSCQ; op welke wijze deze in een nephelometer kan worden veranderd, geven de auteurs niet aan. In plaats van nephelometrie stellen zij naar analogie van de ultramicroscopie den naam „ultraphotometrie" voor.

---

[1]) H. Kamerlingh Onnes en W. H. Keesom, Versl. Kon. Acad. v. Wetensch. Wis- en Natk. Afd. *16*, 667, 1908.

[2]) E. Wilke en Handovsky, Ann. der Physik (4), *42*, 1145, 1913.

[3]) J. T. W. Marshall en H. W. Banks, Proc. Am. Phil. Soc. *54*, 176, 1915.

[4]) Ch. Chéneveau en R. Audubert, Compt. Rend. de l'Acad. d. Sc. *170*, 728, 1920.

[5]) A. Baudouin en H. Bénard, Compt. Rend. de la Soc. de Biol. *83*, 602, 1920.

HOOFDSTUK II.

Toepassingen der nephelometrie.

Algemeene beschouwingen.

Sinds RICHARDS' eerste publicaties over het gebruik van den door hem uitgevonden „nephelometer" bij het bepalen van het atoomgewicht van strontium is door verschillende onderzoekers getracht, het nieuwe instrument dienstbaar te maken aan de bepaling van uiterst geringe hoeveelheden stof. Het springt in het oog, dat, waar het principe van de nephelometrische methoden ligt in het meten van de hoeveelheid vaste stof in suspensoide of colloide oplossingen, dat juist die scheikundige verbindingen het meest geëigend zijn voor deze bepalingswijze, welke in waterige oplossing steeds in colloiden toestand voorkomen. Het is de groote verdienste van KOBER, de tot dusverre uiterst moeielijke en theoretisch onjuiste wijze van bepalen van eiwitten tot een betrekkelijk eenvoudige, slechts zeer weinig tijd vergende, rationeele methode van onderzoek te hebben teruggebracht. Deze onderzoeker heeft voorts aangetoond, dat ook voor andere stoffen, welke niet steeds of uiterst zelden in colloide complexen voorkomen, deze methodiek van toepassing kan worden gebracht, òf door een speciaal reagens te kiezen, òf door aan de te analyseeren oplossing een beschermend colloide toe te voegen, dat in staat is, de bij toevoeging van het reagens zich vormende verbinding in colloide of althans in suspensoide oplossing te houden. Van KOBER [1]) is ook de uitdrukking: „nephelometrische precipiteermiddelen" afkomstig. Hieronder zijn volgens hem te verstaan zoodanige precipiteermiddelen, welke 0,01 % of zwakkere oplossingen quantitatief neerslaan in den vorm van suspensies, die niet merkbaar samenklonteren binnen 10 tot 20 minuten, d.w.z. tijd genoeg laten voor twee tot vijf aflezingen in den nephelometer.

Hoewel, zooals meestal met nieuwe methoden van onderzoek, de nephelometrie nog lang niet algemeen in toepassing wordt gebracht, zijn reeds voor meerdere stoffen nephelometrische bepalingswijzen aangegeven, en wel voor:

---

[1]) Ph. A. Kober, J. Am. Chem. Soc. *35*, 1585, 1913.

chloor; zilver; eiwitten en proteasen; nucleinezuur en nucleasen; purinebasen en urinezuur; phosphor en lecithine; cholesterine en hoogere vetzuren; calcium; magnesium; ammonia; aceton, diaceetzuur en β-oxyboterzuur; vaccins; zwavelzuur.

Chloor.

Door RICHARDS en WELLS [1]) is het eerst de troebeling, welke men in sterk verdunde chlorideoplossingen verkrijgt, door een overmaat van zilvernitraat toe te voegen, nephelometrisch onderzocht. Na hen hebben o.a. KOBER [2]) en KLEINMANN [3]) getracht de zilverchloride-troebeling voor nephelometrische bepalingen te gebruiken; beiden komen echter tot het resultaat, dat deze daarvoor niet geschikt is.

Zilver.

Voor de nephelometrische bepaling van zilver geldt hetzelfde als voor die van chloor.

Eiwitten en proteasen.

Tot de belangrijkste stoffen, welke men met behulp van den nephelometer kan bepalen, behooren wel de eiwitten.

Als typische hydrophile colloiden zijn ze volgens de gewone gravimetrische methode niet exact te bepalen; zij zijn uiterst moeielijk door filtratie af te zonderen, en indien dit al mocht gelukken, dan zijn zij door adsorptie van allerlei andere stoffen zelden zuiver genoeg voor een quantitatieve bepaling. Bovendien zijn ze moeielijk in drogen toestand te verkrijgen. De nephelometrische methode mag daarom voor de bepaling van eiwitten als een bijzondere aanwinst voor de microchemische methodiek worden beschouwd. Als een belangrijk voordeel mag gelden, dat deze bepalingswijze een enorme besparing van tijd meebrengt. Terwijl een bepaling van caseine, globulinen en albuminen in melk volgens de gewone methoden 2 tot 3 dagen duurt, vergt de nephelometrische slechts 20 tot 30 minuten (KOBER) [4]). Als precipiteermiddel dient een 3% oplossing van sulfosalicylzuur.

De gevoeligheid van de reactie is 1: 2.000.000.

Voor de *methodiek* zie men: voor edestine bij KOBER [5]), voor caseine bij KOBER [6]), voor proteasen bij KOBER [5]) [6]), voor caseine, globuline en albumine in melk bij KOBER [4]), voor eiwit in urine bij FOLIN en DENIS [7])

---

[1]) Th. W. Richards, Am. Chem. J. *31*, 325, 1904; vgl. pag. 11.

[2]) Ph. A. Kober, J. of Ind. and Eng. Chem. *10*, 556, 1918.

[3]) H. Kleinmann, Biochem Z. *99*, 115, 1919.

[4]) Ph. A. Kober, J. Am. Chem. Soc. *35*, 1585, 1913.

[5]) Ph. A. Kober, J. of Biol. Chem. *13*, 485, 1912-13.

[6]) Ph. A. Kober, J. Am. Chem. Soc. *35*, 290, 1913, ibid. pag. 1585.

[7]) O. Folin en W. Denis, J. of Biol. Chem. *18*, 263, 1914.

en bij MARSHALL, BANKS en GRAVES [1]), voor eiwit in cerebrospinaalvocht bij PFEIFFER, KOBER en FIELD [2]).

Nucleinezuur en nucleasen.

KOBER en GRAVES [3]) hebben een methode uitgewerkt voor het bepalen van nucleasen, welke berust op de eigenschap van nucleinezuren, in zwak zure oplossingen met proteinen een neerslag van nucleinen te geven.

De methode heeft een gevoeligheid voor gistnucleinezuur van 1: 1.000.000.

Urinezuur en purinebasen.

Het reagens van GRAVES en KOBER [4]) slaat deze stoffen als zilverzouten neer; het neerslag wordt in suspensie gehouden door kippeeiwit gedurende 8—30 minuten. Voor het scheiden van urinezuur en purinebasen geven GRAVES en KOBER twee methoden aan: 1°. oxydatie van het urinezuur met een suspensie van $Mn\ O_2$ en bepalen van het urinezuur uit het verschil in nephelometrische aflezing vóór en na de oxydatie; 2°. een methode, berustende op het feit, dat bij toevoeging van zeer weinig beschermend colloide alleen de purinebasen en bij toevoeging van meer colloide zoowel purinebasen als urinezuur gesuspendeerd blijven; in het verschil tusschen beide aflezingen heeft men een maat voor de hoeveelheid urinezuur.

Phosphorzuur en lecithine.

De verdienste, het eerst de nephelometrische methodiek te hebben dienstbaar gemaakt aan de microchemische bepaling van phosphorzuur, komt toe aan PH. A. KOBER en GRETE EGERER [5]). Zij precipiteerden de phosphaten als phosphorstrychninemolybdaat met behulp van een reagens, dat een wijziging was van dat van POUGET en CHOUCHAK [6]), doordat het salpeterzuur in dit reagens vervangen was door zoutzuur. Hierdoor verkregen KOBER en EGERER een houdbare oplossing, welke niet spontaan troebel werd, en kon het precipiteermiddel voor serien nephelometrische onderzoekingen worden gebruikt. BLOOR [7]) heeft dit reagens in een meer geconcentreerden vorm gebruikt, nadat hij een vroeger door hem aan-

---

[1]) Marshall, Banks en Graves, Arch. int. Med. *18*, 250, 1916.

[2]) Pfeiffer, Kober en Field, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *12*, 133, 1915.

[3]) Ph. A. Kober en Sara S. Graves, J. Am. Chem. Soc. *36*, 1304, 1914.

[4]) Sara S. Graves en Ph. A. Kober, J. Am. Chem. Soc. *37*, 2430, 1915.

[5]) Ph. A. Kober en Grete Egerer, J. Am. Chem. Soc. *37*, 2373, 1915.

[6]) Pouget en Chouchak, Bull. Soc. Chim *4* Serie *5*, 104, 1909; *4* Serie *9*, 649, 1911.

[7]) W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *36*, 33, 1918.

geven nephelometrische bepalingswijze, welke berustte op de vorming van zilverphosphaat [1]), had verlaten.

Door MEIGS [2]) is geconstateerd, dat de omstandigheden (bijv. de temperatuur), waaronder het reagens wordt bereid, van grooten invloed zijn op de werkzaamheid er van. Deze onderzoeker wees er tevens op, dat de zuurgraad van reagens en te onderzoeken vloeistof een beslissenden invloed heeft op de hoeveelheid neerslag, die verkregen wordt, en dat KOBER en EGERER in hun artikel zich zelve op verschillende plaatsen tegenspreken, wat betreft den zuurgraad, welken zij bij hun onderzoekingen aanwendden.

KLEINMANN [3]) heeft zoowel bij het reagens van POUGET en CHOUCHAK als bij dat van KOBER en EGERER den optimalen zuurgraad vastgesteld; door systematische verandering van alle samenstellende stoffen in het laatstgenoemde heeft hij een houdbaar reagens verkregen, dat in 25cc. 0,001 milligram $P_2 O_5$ kan aantoonen met een nauwkeurigheid van 0,5 %. Hij heeft het reagens van KOBER en EGERER niet volgens het oorspronkelijke voorschrift kunnen bereiden.

KLEINMANN heeft verder aangetoond, dat ook met pyridine in plaats van met strychnine bevredigende resultaten kunnen worden bereikt.

Een andere nephelometrische methode, van SERGER [4]), berust op de vorming van colloidaal molybdeenphosphorzuur; daar echter volgens KLEINMANN de troebeling uiterst sterk afhankelijk is van de temperatuur en van de ionen, in de te onderzoeken vloeistof aanwezig, en volgens SERGER zelf de gevoeligheidsgrens ligt tusschen 91 en 196 mG $P_2 O_5$ in 100.000 deelen water, is deze methode weinig aanbevelenswaardig.

Hetzelfde kan gezegd worden van het reagens van MEDINGER [5]), dat als houdbaar wordt aanbevolen. Uit een groote reeks proeven is mij gebleken, dat dit salpeterzure reagens zijn „houdbaarheid" dankt aan een veel te sterken zuurgraad, waardoor het voor nephelometrische onderzoekingen niet te gebruiken is. Maakt men het reagens minder zuur, dan wordt het evenals dat van POUGET en CHOUCHAK zeer spoedig bruin en troebel.

Met de strychninemolybdeenzure reagentia zijn reeds talrijke, belangrijke onderzoekingen verricht. Zoo heeft BLOOR bepaald de hoeveelheden van de verschillende vormen, waarin het phosphorzuur in het menschelijke bloed voorkomt [6]), hij heeft nagegaan verschillende physiologische en pathologische omstandigheden, welke invloed hebben op het lecithinegehalte van het bloed (de lecithine als phosphor bepaald.) [7]).

---

[1]) W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *22*, 33, 1915; *24*, 447, 1916.

[2]) E. B. Meigs, J. of Biol. Chem. *36*, 335, 1918.

[3]) H. Kleinmann, Biochem. Z. *99*, 115, 1919.

[4]) H. Serger, Chemiker Z. *39*, 163, 1915.

[5]) P. Medinger, Chemiker Z. *39*, 781, 1915.

[6]) W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *36*, 33, 39, 1918.

[7]) W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *24*, 447, 1916; *25*, 577, 1916; *26*, 417, 1916; W. R. Bloor en D. J. Mac. Pherson, J. of Biol. Chem. *31*, 79, 1917; W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *33*, X, 1918.

Zeer vele nephelometrische phosphorbepalingen bij gezonde en zieke menschen zijn verricht door JOH. FEIGL [1]), waarvan de resultaten zijn neergelegd in vele zeer uitvoerige, slecht leesbare artikels.

In een van zijn laatste onderzoekingen past hij de microchemische werkwijze van BANG toe op de nephelometrische phosphaatbepalingen, waardoor voor een bepaling slechts 0,100 tot 0,200 milligram bloed benoodigd zijn. De maximale proeffout is daarbij voor de geheele bepaling ± 5 %.

Onlangs heeft IVERSEN [2]) een titrimetrische microchemische bepalingswijze van phosphaten aangegeven, welke een wijziging is van de methode van NEUMANN. Hij kon met deze methode hoeveelheden phosphor van 0,015 tot 0,121 m.G. aantoonen met een absolute fout van ± 0,003 m.G. De methode is dus iets minder gevoelig dan de nephelometrische.

Cholesterine en hoogere vetzuren.

Voor de bepaling van vetten in bloed [3]) en melk [4]) is door BLOOR in 1914 een nephelometrische methode aangegeven. Volgens deze methode worden de vetten in alcohol-aether (3: 1) opgelost, de vetten verzeept en daarna in gedestilleerd water opgevangen, waardoor een emulsie ontstaat, welke in den nephelometer kan worden bepaald. Als standaardoplossing wordt gebruikt een alcohol-aetheroplossing van zuivere trioleine; later beveelt BLOOR oleinezuur als standaard aan. Een methode van LAWS en BLOOR [5]), om vet te bepalen in faeces, werd verbeterd door SHARPE [6]).

Een bezwaar tegen deze bepaling is, dat zij voor het bloedvet binnen 5 minuten en voor melkvet binnen een uur moet worden verricht, omdat de waarden anders geheel onbetrouwbaar worden wegens het uitvlokken van het reagens.

---

[1]) Joh. Feigl, Phosphate im menschl. Blutserum, Biochem. Z. *81*, 380, 1917; *83*, 81, 1917; *83*, 218, 1917; 84, 231, 1917; *86*, 395, 1918: *87*, 237, 1918; *92*, 1, 1918; *94*, 293, 1919; *94*, 304, 1919; *102*, 131, 1920.

Joh. Feigl en H. Luce, Über acute gelbe Leberatrophie, Biochem. Z. *79*, 162, 1917; *79*, 207, 1917; *86*, 1, 1918; *86*, 48, 1918.

Joh. Feigl, Lipoide, Biochem. Z. *88*, 53, 1918; *90*, 1, 1918; *90*, 173, 1918; *92*, 282, 1918; *93*, 257, 1919.

Joh. Feigl, Nerven-und Geisteskrankh. Biochem. Z. *86*, 395, 1918; *88*, 53, 1918.

Joh. Feigl, Lecithinämie, Biochem. Z. *90*, 36, 1918.

Joh. Feigl, Mikromethodik, centralbl.chem. Med. 1920.

Joh. Feigl, Hyperphosphatämie bei Morbus Brightii, Z. f. physiol. Chem. *111*, 280, 1920.

[2]) P Iversen, Biochem. Z. *104*, 22, 1920; *109*, 211, 1920.

[3]) W. R. Bloor, J. of Biol. Chem. *17*, 377, 1914; *23*, 317, 1915.

[4]) W. R. Bloor, J. Am. Chem. Soc. *36*, 1300, 1914.

[5]) Laws en Bloor, Am. J. of Diseases of Children *11*, 1916.

[6]) J. S. Sharpe, Biochem. J. *11*, 96, 1917.

Csonka [1]) heeft emulsies van cholesterine, oleinezuur, palmitinezuur en stearinezuur vergeleken met een vasten standaard [2]) en vond, dat de „nephelometrische waarde" [2]) afhankelijk is van den zuurgraad, voor de onderzochte vetzuren verschillend is en, voor zoover cholesterine en oleinezuur betreft, door het verzeepingsproces en door toevoeging van verschillende stoffen wordt beïnvloed.

Murlin en Riche [3]) hebben getracht deze bezwaren te ondervangen, door de vetoplossing na verzeeping in plaats van in water in een zure oplossing van 0,05 % gelatine te gieten. Op deze wijze blijven de suspensies gedurende uren constant.

Het schijnt mij echter gewenscht, dat de nephelometrische bepalingswijze van vetten nauwkeurig wordt getoetst met den door mij in Hoofdstuk IV aangegeven nephelometer met vasten standaard.

Calcium.

Een snelle, gemakkelijke, microchemische, nephelometrische methode voor de bepaling van calcium met een proeffout van minder dan 1 % is aangegeven door Lyman [4]). Deze methode, die uitgewerkt is voor bloed en voor melk, berust op het neerslaan van het calcium als calciumoxalaat volgens Mc. Crudden [5]). Het neerslag wordt door toevoeging van stearinezuur, oliezuur en ammoniumcarbonaat aan het reagens in suspensie gehouden. Lyman [6]) heeft met deze methode een groot aantal calciumbepalingen gedaan bij allerlei ziekten. Denis en Minot [7]) hebben de methode met eene kleine wijziging voor bepalingen in bloed toegepast. Volgens Kober [8]) blijft de suspensie gedurende uren goed.

In nauwkeurigheid kunnen de titrimetrische methoden volgens De Waard [9]) en Jansen [10]) met die van Lyman worden gelijk gesteld.

Een eenvoudige nephelometrische methode, speciaal voor klinische doeleinden, is aangegeven door Pern [11]). Ook bij deze methode wordt het calcium als oxalaat neergeslagen.

Magnesium.

W. Denis [12]) heeft onlangs een methode beschreven voor nephelometrische bepalingen van magnesium in bloed. Het wordt als magnesiumammoniumphosphaat neergeslagen; daarna wordt het

---

[1]) F. A. Csonka, J. of Biol. Chem. *34*, 577, 1918; *41*, 243, 1920.

[2]) Zie pag. 43.

[3]) Murlin en Riche, cit. bij Kober, J. of Ind. and Eng. Chem. *10*, 556, 1918.

[4]) H. Lyman, J. of Biol. Chem. *29*, 169, 1917.

[5]) F. H. Mc. Crudden, J. of Biol. Chem. *10*, 187, 1911—12.

[6]) H. Lyman, J. of Biol. Chem. *30*, 1, 1917.

[7]) W. Denis en A. S. Minot, J. of Biol. Chem. *41*, 357, 1920.

[8]) Ph. A. Kober, J. of Ind. and Eng. Chem. *10*, 556, 1918.

[9]) D. J. de Waard, Biochem. Z. *97*, 176, 1919; ibid. p. 186.

[10]) W. H. Jansen, Z. f. physiol. Chem. *101*, 176, 1917.

[11]) S. Pern, Proc. Roy. Soc. Vict. *30*, 137, 1918.

[12]) W. Denis, J. of Biol. Chem. *41*, 363, 1920.

neerslag weer in oplossing gebracht en als phosphorstrychnine-molybdaat bepaald.

DENIS vond van bekende hoeveelheden opgelost magnesium (van 0,02 tot 0,10 m G.) gemiddeld 94 % terug. Deze nauwkeurigheid komt vrijwel overeen met die, welke bij de titrimetrische methode volgens MARRIOT en HOWLAND [1]) wordt verkregen.

Ammonia.

Voor nephelometrische bepalingen van ammonia is door SARA S. GRAVES [2]) een reagens aangegeven, dat een wijziging is van het bekende reagens van NESSLER, maar in tegenstelling met dit laatste niet aan ontleding onderhevig is. Als beschermend colloide wordt een 0,003 % zetmeeloplossing gebruikt. Zij heeft deze methode met succes toegepast bij *stikstofbepalingen volgens* KJELDAHL, waarbij het vervelende, bronnen van fouten opleverende destilleeren kon worden vermeden.

KOBER [3]) geeft aan, dat de gevoeligheid van de reactie voor NHOH bedraagt 1: 160.000.000.

Aceton, diaceetzuur en β-oxyboterzuur.

De eerste nephelometrische bepalingswijze van de acetonstoffen is afkomstig van Mc. KIM MARRIOTT [4]). Het aceton wordt hierbij bepaald met het reagens van SCOTT en WILSON [5]).

FOLIN en DENIS [6]) hebben deze methode toegepast op de bepaling van acetonlichamen in de urine.

MARRIOT heeft volgens zijn methode onderzoekingen gedaan over de stofwisseling van de acetonverbindingen [7]) en over het gehalte van het bloed aan deze stoffen onder normale omstandigheden en bij acidosis [8]).

Geen van de auteurs geeft de gevoeligheid van de methode aan.

Vaccins.

In den laatsten tijd zijn een paar methoden gepubliceerd voor de nephelometrische bepaling van het aantal bacterien in een vaccin[9]). Waar de microscopische telmethode evenzeer als de andere telling door het meten van de troebelheid van de vaccins gemakkelijk aanleiding geeft tot het maken van fouten en bovendien veel tijd

---

[1]) W. Mc. Kim Marriott en J. Howland, J. of Biol. Chem. *32*, 233, 1917.
[2]) Sara Stowell Graves, J. Am. Chem. Soc. *37*, 1171, 1915.
[3]) Ph. A. Kober J. of Ind. and. Eng. Chem. *10*, 556, 1918.
[4]) W. Mc. Kim. Marriott, J. of Biol. Chem *16*, 293, 1913; *18*, 507, 1914.
[5]) Scott en Wilson, J. of Physiol *42*, 444, 1911.
[6]) O. Folin en W. Denis, J. of Biol. Chem. *18*, 263, 1914.
[7]) W. Mc. Kim Marriott, J. of Biol. Chem. *18*, 241, 1914.
[8]) W. Mc. Kim Marriott, J. of Biol. Chem. *18*, 507, 1914.
[9]) G. C. Dunham, J. of Immunol. *5*, 337, 1920. Journ. of milit. Surgery, Oct. 1920.

kost, is deze nephelometrische telmethode, welke bij korten arbeidsduur een hoogstens even groote proeffout (ten hoogste 10 %) geeft als de microscopische, zeer aanbevelenswaardig. Zij heeft bovendien het voordeel, dat de kleurbaarheid, welke een zoo belangrijke factor is bij de microscopische methode, van geen invloed is op het resultaat.

Zwavelzuur.

Volgens een persoonlijke mededeeling van KOBER zal binnenkort een nephelometrische micromethode voor het bepalen van sulfaten worden gepubliceerd.

HOOFDSTUK III.

Een nieuwe nephelometer.

Daar het tengevolge van den Europeeschen oorlog niet mogelijk was, een nephelometer volgens KOBER uit Amerika te betrekken — die volgens KLEINMANN en FEIGL was nog niet gepubliceerd — en er destijds (1918) geen nauwkeurige microchemische bepalingswijze voor phosphor bestond behalve de nephelometrische, was ik voor onderzoekingen over het phosphaatgehalte van het bloed gedwongen, zelf een nephelometer te construeeren. Ik was daartoe in staat, dank zij de bijzondere tegemoetkomendheid van den directeur van het Physiologische Instituut te Groningen, Prof. Dr. H. J. HAMBURGER, het voortreffelijke instrumentarium van dit instituut en de kundige medewerking van het technische personeel, speciaal van den chef-instrumentmaker, den heer L. J. H. BRAND. De nephelometer, zoowel in zijn oorspronkelijken als in zijn verbeterden vorm, is behalve wat de optische onderdeelen betreft, geheel in de werkplaatsen van het Physiologische Instituut vervaardigd.

Het oorspronkelijk door ons gebouwde model was in het algemeen een navolging van dat van KOBER, voldeed echter niet tengevolge van het ontbreken van goed gekitte proefbuizen en dompelaars; eerst toen met het sluiten van den vrede de normale handelsbetrekkingen met Amerika zich langzamerhand herstelden, was het mogelijk, de door KOBER beschreven proefbuizen en dompelaars te verkrijgen en daardoor den nephelometer met goede resultaten te gebruiken.

Van de in Hoofdstuk I beschreven nephelometers komen eigenlijk slechts twee voor een uitvoeriger bespreking in aanmerking, nl. de nieuwste nephelometer van KOBER en die van KLEINMANN en FEIGL. De tyndallmeter en daarmede overeenkomende apparaten zijn niet geschikt voor snelle, quantitatieve onderzoekingen, terwijl de nephelometer van MARSHALL en BANKS en die van CHÉNEVEAU en AUDUBERT minder nauwkeurig zijn dan eerstgenoemde.

De voornaamste verschillen tusschen den nephelometer van KOBER en dien van KLEINMANN en FEIGL zijn de volgende:

1°. Bij den nephelometer van KOBER is het oculair boven aangebracht, bij dien van KLEINMANN en FEIGL ter zijde. Dit laatste vergemakkelijkt het aflezen zeer.

2°. De stand van het oculair maakt het bij het toestel van K. gewenscht, het apparaat schuin te zetten; het is echter exacter, wanneer, zooals bij den nephelometer van K.-F., het licht loodrecht op de vertikaal geplaatste proefbuizen valt.

3°. Het oculair van K. draagt een rand tot steun van de oogkas; hierdoor wordt het onbewegelijk houden van het oog bevorderd en aldus de subjectiviteit van de waarnemingen verminderd.

4°. Bij het toestel van K. reikt het lichtscherm even ver naar beneden als de dompelaars; bij dat van K.-F. 2 c.M. verder. In laatstgenoemd instrument is daardoor tusschen dompelaar en belichte vloeistofkolom een laag, welke het licht uit het belichte gedeelte weerkaatst. Deze inrichting is dus theoretisch onjuist.

5°. De proefbuizen van K. hebben vlakke, ingesmolten bodems, die van K.-F. bolvormige; dit bolvormige gedeelte van de proefbuis wordt door het lichtscherm gemaskeerd, zoodat ook hiervoor het bezwaar sub 4° geldt.

6°. De dompelaars van K. zijn van terzijde ondoorzichtig (zwart), die van K.-F. niet (gematteerd wit); het bezwaar sub 4° geldt dus ook voor de vloeistof rondom de dompelaars.

7°. In het toestel van K. worden de proefbuizen op en neer bewogen, in dat van K.-F. niet. Hoewel het voorzichtig op en neer bewegen van de proefbuizen practisch geen invloed heeft op de samenstelling van de suspensie, is de opstelling volgens K.-F. theoretisch juister. Het aldus verkregen voordeel bij het instrument van K.-F. weegt echter niet op tegen de nadeelen van sub 4°—6°.

8°. De proefbuizen van K. zijn slechts ± 1 m.M. wijder dan de dompelaars, die van K.-F. zijn 2 m.M. wijder.

9°. Het toestel van K. heeft een schommelend nulpunt, dat van K.-F. bezit een constant nulpunt, wat een aanmerkelijk voordeel is.

10°. K. werkt met zooveel mogelijk evenwijdig licht, een wolframlamp met geconcentreerd dradennet in het brandpunt van een Ramsden-oculair; K.-F. werken met divergeerend — prac-

tisch evenwijdig(?) — licht, een Osramlamp op 75 c.M. afstand. Beide lichtbronnen zijn verre van ideaal, die van K. theoretisch beter dan die van K.-F.

11°. De hoogte van de belichte vloeistofkolom is in het toestel van K. niet evenredig met de concentratie van de suspensie bij gelijke grootte van de gesuspendeerde deeltjes; bij K.-F. is dit wel het geval. KLEINMANN schrijft dit belangrijke voordeel toe aan de wijdere proefbuizen [1]).

12°. Volgens KLEINMANN is zijn apparaat veel lichtsterker dan dat van KOBER. Hierbij moet echter in aanmerking worden genomen, dat KLEINMANN KOBER's nieuwste instrumenten niet kende.

Beide toestellen hebben dus hunne gebreken; wij hebben getracht een nephelometer te bouwen, die de voordeelen van beide instrumenten in zich vereenigt en hun fouten zooveel mogelijk uitschakelt.

Wij hebben ons te dien einde de volgende eischen gesteld voor een nauwkeurigen, gemakkelijk te hanteeren nephelometer:

1°. Het toestel moet lichtsterk zijn.

2°. Het moet zooveel mogelijk stofvrij zijn.

3°. Het moet gemakkelijk te hanteeren zijn en snelle bepalingen mogelijk maken.

4°. Het moet op een vaste plaats tegenover de lichtbron zijn opgesteld.

5°. De lichtbron moet practisch evenwijdige stralen uitzenden, gelijkmatig licht geven en het toestel beiderzijds even sterk belichten.

6°. Er mag geen nullicht zijn.

7°. Het toestel moet, vertikaal geplaatst, gemakkelijk bepalingen toestaan.

8°. Het oculair moet de oogkas steunen en van een zeer fijn gaatje zijn voorzien, teneinde ongelijkmatige helderheid van de gezichtsvelden ten gevolge van veranderingen in den stand van het oog te voorkomen [2]).

9°. De dompelaars moeten zijn als bij het toestel van KOBER, zwart met doorzichtige, aangesmolten of -gegoten bodems van optisch zuiver glas.

---

[1]) Zie pag. 46.

[2]) Zie Ph. A. Kober, J. of Ind. and Eng. Chem. *10*, 556, 1918,

10°. De proefbuizen moeten eveneens zijn, zooals door KOBER is aangegeven, van doorzichtig, optisch zuiver glas met aangesmolten of aangegoten zwarte, platte bodems.

11°. De geheele vloeistofkolom tusschen den bodem van den dompelaar en dien van de proefbuis moet gelijkmatig worden belicht; de vloeistof rondom den dompelaar mag niet direct worden belicht.

12°. De nephelometer moet gemakkelijk in een colorimeter kunnen worden omgezet.

De nieuwe nephelometer.

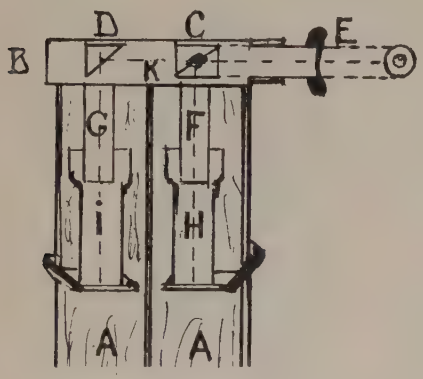


Fig. 10. Gang der lichtstralen in den nieuwen nephelometer.

Het nieuwe toestel is hoog 40 c.M., breed 8,5 c.M., diep 10 c.M.

Het bestaat uit een vertikale metalen plaat *a* (fig. 10), waarop de houder *b* van de prisma's *c* en *d* rust. Aan dezen houder zijn bevestigd de dompelaars *f* en *g*, waaromheen de proefbuizen *h* en *i* glijden

Tusschen de proefbuizen is een scherm *k* geplaatst, hetwelk voorkomt, dat licht van de eene buis in de andere wordt gereflecteerd.

De gang der lichtstralen blijkt uit fig. 10. Licht uit buis *h* wordt geworpen door dompelaar *f* naar het prisma volgens LUMMER-BRODHUN *c*, waarvan het middelste vakje het licht weerkaatst naar het oculair *e*. Het licht uit buis *i* wordt, nadat het door den dompelaar *g* is gegaan, totaal gereflecteerd door prisma *d*, passeert vervolgens prisma *c* om het middenste vakje heen,

zoodat in oculair *e* een gezichtsveld volgens LUMMER-BRODHUN wordt gevormd, waarvan het middenveld correspondeert met proefbuis *h* en het buitenveld met proefbuis *i*. Het oculair is van een uitstekenden rand voorzien, waartegen de oogkas rust gedurende het onderzoek; de opening in het midden van het oculair is niet grooter dan een speldeknop. De proefbuizen worden opgesteld op van een opening voorziene platen. *Hierdoor is het mogelijk, het toestel als een colorimeter te gebruiken, eenvoudig door de nephelometerproefbuizen te vervangen door colorimeterbuizen.* De platen zijn bevestigd aan een koperen ring, welke glijdt om een gladde koperen buis en daaraan met een klemschroef kan worden vastgemaakt. De koperen buis kan worden op- en neerbewogen langs een van een dubbelen knop

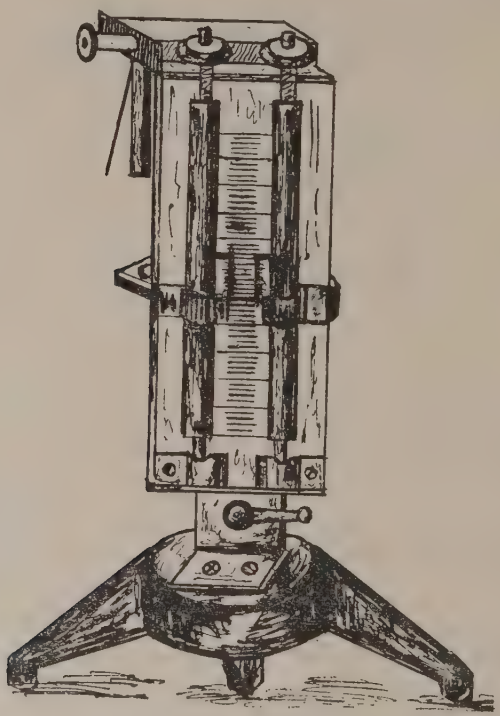


Fig. 11. De nieuwe Nephelometer.

voorziene, vertikale stelschroef met een spoed van 1 m.M. Men kan snel ruw instellen door middel van den glijdenden ring en, na den ring met de klemschroef aan de buis te hebben bevestigd, nauwkeurig instellen met de vertikale stelschroef.

De koperen ring is van een nonius voorzien, welke over een verdeelde schaal glijdt en een aflezing tot op 0,1 m.M. nauwkeurig toelaat. De schaal wordt met een klein electrisch lampje tijdens het aflezen belicht en is afneembaar. De nonii zijn afneembaar en verplaatsbaar; men kan dus het nulpunt van het toestel steeds nauwkeurig vaststellen (fig. 11).

Als dompelaars en proefbuizen werden de door KOBER aangegevene met aangesmolten bodems gebruikt.

De maten van de door mij gebezigde buizen zijn:

dompelaars: lang 51 m.M. (beneden het koperen aanzetstuk)
diam. 13 m.M.

proefbuizen: lang 45 m.M. (beneden het verwijde gedeelte).
binnendiam. $15^1/_2$ m.M.

Het toestel staat op een asbestplaat, welke aan de onderzoektafel bevestigd is. In deze plaat zijn drie gaten geboord voor de pooten van den nephelometer, opdat deze zich steeds op dezelfde plaats ten opzichte van de eveneens aan de onderzoektafel bevestigde lampenkast bevindt. De nephelometer is in een kast geplaatst, waarvan de zijwanden uit zwarte gordijnen bestaan, zoodat geen licht naar buiten valt en toch gemakkelijk kan worden ingesteld.

Bij de keuze van de lichtbron ging ik uit van het principe, door KOBER aangegeven, dat men moet trachten bij nephelometrische bepalingen practisch evenwijdig licht te verkrijgen. KOBER [1]) gebruikt hiervoor, daar booglampen te ongelijkmatig en wisselend licht geven, een wolframlampje, waarvan het dradennet slechts 1 c.M^3 groot is, en plaatst dit in het brandpunt van een Ramsden-oculair. Daar het wegens den Europeeschen oorlog niet mogelijk was, een dergelijk lampje uit Amerika te betrekken, verzocht ik de N.V. Philips' Gloeilampenfabrieken te Eindhoven, een lampje van ± 100 kaarsen te construeeren met een zoo klein mogelijk lichtgevend oppervlak. Deze waren aanstonds daartoe bereid en hebben op mijn verzoek een „Edison"lampje van 100 kaarsen gefabriceerd met een lichtgevend oppervlak van 1 c.M^2. Dit benadert het gewenschte „puntvormige" licht dus nog veel meer dan het door KOBER gebruikte lampje. Het heeft bovendien het voordeel, dat het in een gewone lampenkas voor projectiedoeleinden kan worden aangebracht. Een

[1]) Vgl. pag. 14.

dergelijke kast met verstelbaren condensor heb ik met zeer goede resultaten bij mijn proeven gebruikt. De lamp heeft ± 80 volt noodig, om op goede lichtsterkte te branden. Daar in elk goed ingericht laboratorium een schakeltafel, of althans een weerstandsbank, aanwezig is, behoeft dit geen bezwaar te zijn voor algemeene toepassing.

Lampekast en toestel staan op vaste plaatsen op een tafel op rolletjes, kunnen daardoor gemakkelijk worden verplaatst, zonder dat voor een volgende bepaling opnieuw instellen noodig is.

Methodiek.

Alle proeven werden verricht in een absoluut donkere kamer. Vóór de waarnemingen werd ± 10 minuten in het duister doorgebracht, teneinde de oogen aan geringe lichtintensiteiten te doen gewennen. Tusschen de bepalingen in werd even gerust, na een aantal aflezingen gedurende eenige minuten, om overinspanning van de oogen te voorkomen.

Als *reinigingsvloeistof* voor de proefbuizen diende een oplossing, welke 5 % seignettezout en 0,5 % natricumcarbonaat bevatte. Hierin werden de buizen gedurende 15 minuten verhit in een met een glasplaat bedekte indampschaal op een kokend waterbad. Vervolgens werd de indampschaal snel afgekoeld in een bak met koud water, waarna de buizen met gedestilleerd water werden uitgespoeld. Door deze behandeling lossen alle vettige verontreinigingen, welke zoo dikwijls in chemisch glaswerk voorkomen, geheel op en worden de buizen water-helder; de alkalische seignettezoutoplossing, op deze wijze gebruikt, voldeed beter dan de gewone behandeling met chroomzuur. Ook voor het reinigen van pipetten, haematocryten en andere nauwkeurige instrumenten heb ik deze oplossing met zeer bevredigende resultaten aangewend. Voor met canadabalsem of andere harsen gekitte buizen is ze echter niet aan te bevelen, daar mij gebleken is, dat met canadabalsem gekitte praeparatenglazen (dek- en objectglazen), na gedurende een half uur op bovenvermelde wijze verhit te zijn, loslaten en na zorgvuldig afwrijven met een zacht doekje weer voor het gebruik gereed zijn, ook al was de canadabalsem reeds geheel verharst. Integendeel, voor het verwijderen van canadabalsem uit een groote hoeveelheid praeparatenglazen is de hierboven beschreven methode boven de algemeen gebrui-

kelijke met het onaangenaam riekende xylol aanbevelenswaardig. Wanneer de nephelometerbuizen in gedestilleerd water worden bewaard, is de bewerking met de alkalische seignettezoutoplossing hoogstens eenmaal per week noodig, om de buizen de maximale doorschijnendheid te doen behouden.

De dompelaars werden vóór het gebruik met een lapje met vetvrije petroleumaether, daarna met alcohol 96 % en hierop met een droog doekje afgewreven, vervolgens met gedestilleerd water goed afgespoeld en twee maal in de met de te onderzoeken suspensie telkens opnieuw gevulde nephelometerbuizen gedompeld; eerst na deze bewerking werden de nephelometerbuizen met de te onderzoeken vloeistof voor de bepaling gevuld.

Na de proef werden de nephelometerbuizen eenige malen met gedestilleerd water uitgespoeld en in een met een deksel afgesloten schaal met gedestilleerd water bewaard.

De dompelaars werden na afloop met gedestilleerd water grondig afgespoeld, gedroogd en daarna met vetvrije petroleumaether en met een droog lapje nogmaals afgewreven.

De standaardoplossing werd steeds in de het verst van den waarnemer verwijderde proefbuis onderzocht.

Resultaten.

De nephelometer werd geijkt met *glycogeenoplossingen*, daar deze gedurende tenminste twee uren houdbaar bleken te zijn.

De resultaten van de met dit doel verrichte proeven zijn neergelegd in de tabellen I—VII; de in deze en de volgende tabellen voorkomende getallen duiden de hoogte van de belichte vloeistofkolommen in tiende millimeters aan.

Uit tabellen I tot en met IV blijkt:

1°. Het toestel heeft een constant nulpunt;

2°. Dit nulpunt is voor verschillende waarnemers verschillend;

3°. De parallelbepalingen van elke proef verschillen ± 1 % van het gemiddelde, de eindresultaten van de verschillende gelijke proeven zijn echter op ten hoogste 0,2 % nauwkeurig.

TABEL I.

0,5 % *glycogeen*oplossing; standaardoplossing *(S)* op 100.
Vergelijkingsoplossing *(y)* = 100 % van *S*.

Datum van onderzoek	23-VI-'20		24-VI-'20		25-VI-'20	26-VI-'20	29-VI-'20	30-VI-'20	
Waarnemers	W.	v. D.	W.	v. D.	v. D.	W.	W.	W.	v. D.
Parallel-bepalingen	99	95	99	96	96	100	99	99	96
	99	95	99	96	96	101	101	100	95
	100	97	98	96	96	99	100	102	97
	99	95	100	97	96	99	98	100	97
	99	95	100	97	97	99	99	98	98
	100	97	100	97	95	98	100	100	96
	99	98	98	97	97	100	101	100	95
	100	97	102	97	97	100	98	98	95
	101	97	100	96	97	99	99	99	96
	100	96	99	96	96	98	99	98	96
Gemiddelde	*99,6*	96,2	*99,5*	96,5	96,3	*99,3*	*99,4*	*99,4*	96,1

TABEL II.

0,3 % *glycogeen*-oplossing; $S = 150$; $y = 100$ %.

Datum van onderzoek	23-VI-'20		26-VI-'20	26-VI-'20
Waarnemers	W.	v. D.	v. D.	W.
Parallel-bepalingen	151	145	144	150
	151	144	146	151
	149	145	144	150
	151	143	145	149
	150	145	145	149
	149	146	145	150
	150	144	145	150
	151	145	143	150
	149	144	145	149
	150	146	144	152
Gemiddelde . . .	*150,1*	144,7	144,6	*150*

TABEL III.

0,3 % *glycogeen*-oplossing; $S = 200$; $y = 100$ %.

Waarnemers	W.	v. D.
Parallel-bepalingen	201	196
	200	198
	202	196
	199	198
	200	195
	200	197
	199	197
	202	198
	203	197
	201	198
Gemiddelde . .	*200,7*	197

TABEL IV.

0,1% *glycogeen*-oplossing; $S = 300$; $y = 100$%.

Waarnemer	W.
Parallel-bepalingen	300
	297
	297
	301
	298
	302
	303
	297
	300
	300
Gemiddelde . .	299,5

TABEL V.

0,3 % *glycogeen*oplossing; $S = 100$; $y = 50$ %.

Datum van onderzoek	23-VI-'30.	26-VI-'20.	30-VI-'20.
Waarnemer.	V. D.	W.	W.
Waarde voor $y = 100$ % (Tab. I)	96.2	99.3	99.4
Parallelwaarden voor $y = 50$ %.	193	197	201
	191	200	197
	193	201	198
	194	197	200
	194	198	197
	191	202	200
	191	202	198
	189	198	200
	190	197	201
	193	198	199
Gemiddelde voor $y = 50$ %.	191.9	199	199.1
Berekend $y = 50$ %.	192.4	198.6	198.8
Verschil in 0.1 m.M.	0.5	0.4	0.3
Verschil in %.	0.26	0.20	0.15

TABEL VI.

0,3 % *glycogeen*oplossing; van elke proef 10 parallelbepalingen.

DATUM	Waarnemer	S	$y = 100\%$ Tabel I-IV	y, in %	y, gevonden	y, berekend	Verschil in 0,1 m.M.	Verschil in %
26-VI-'20	W.	150	150	50 %	300,5	300	0,5	0,16
24-VI-'20	W.	100	99,5	75 %	133,7	132,7	1.—	0,75
24-VI-'20	v. D.	100	96,5	75 %	129,5	128,7	0,8	0,62
25-VI-'20	v. D.	150	144,6	75 %	194,5	192,8	1,7	0,88
26-VI-'20	W.	150	150	75 %	199,7	200	0,3	0,15

In de proeven van tabellen V en VI werden de verdunningen bereid, door de glycogeenoplossing van 0,3 % met de benoodigde hoeveelheid gedestilleerd water te verdunnen, ten einde deeltjes van dezelfde grootte te behouden.

Uit deze proeven kunnen wij besluiten, dat bij gelijke grootte van de gesuspendeerde deeltjes de gevonden verhoudingen overeenkomen met de hypothetische $x = \frac{s}{y}$ met een proeffout van $\pm$ 0,5 %. Voor het verkrijgen van deze nauwkeurigheid zijn 5 parallelbepalingen voldoende. Deze resultaten komen overeen met de waarnemingen van KLEINMANN en vertoonen dezelfde graad van nauwkeurigheid als die van KOBÉR en KLÉINMANN.

Wij zien echter bovendien uit de waarden, door Mej. v. D. verkregen, dat het niet eens noodig is, dat het toestel zoodanig is opgesteld, dat bij dezelfde concentratie van standaard- en vergelijkingssuspensie de belichte kolom van beide even hoog is; ook indien dit niet het geval is, worden goede resultaten bereikt.

Ter contrôle zijn nog eenige proeven verricht met andere suspensies. Als voorbeeld daarvan geven wij de volgende tabel.

TABEL VII.

*Edestine*oplossing, 0,01 %, bereid volgens het voorschrift van KOBER en EGERER). De verdunningen werden gemaakt door bij de edestinesuspensie de gewenschte hoeveelheid NaCl (verzadigde oplossing 1: 3) te voegen.

S, y	$S = 100$ $y = 100\,\%$			$S = 200$ $y = 100\%$	$S = 100$ $y = 100\%$
DATUM	23-VIII-'20		24-VIII-'20	24-VIII-'20	24-VIII-'20
Parallel-bepalingen	100	100	100	200	200
	99	100	100	202	201
	100	100	102	198	200
	100	100	100	200	200
	100	100	100	198	200
	97	100	100	200	200
	100	100	97	200	200
	97	98	—	200	202
	100	100	—	200	199
	100	—	—	200	—
Gemiddelde . .	99,3	99,8	99,9	199,8	200,2

Ook uit deze tabel blijkt, dat het nulpunt constant is en dat bij gelijke grootte der gesuspendeerde deeltjes de concentratie van de oplossing omgekeerd evenredig is (bij een proeffout van ± 0,5 %) met de hoogte van de belichte vloeistofkolom.

HOOFDSTUK IV.

Een nephelometer met vasten standaard.

Kritiek der nephelometrie.

Hoewel, gelijk wij in de voorgaande hoofdstukken gezien hebben, de nephelometrie een belangrijke aanwinst voor de microchemie beteekent, omdat zij ons in staat stelt, in een minimum van tijd bijzonder nauwkeurige resultaten te verkrijgen, bestaan er toch tegen deze methode van onderzoek verschillende ernstige bezwaren.

Het fundamenteele bezwaar, waarop alle andere berusten, is wel het ontbreken van een bekenden, vasten standaard. De onbekende oplossing wordt vergeleken met een op dezelfde wijze behandelde oplossing van dezelfde of van een verwante stof. Dit komt echter feitelijk hierop neer, dat de eene onbekende met een andere wordt gemeten; want in de eerste plaats is het uiterst moeilijk, de standaardoplossing op geheel dezelfde wijze als de te onderzoeken vloeistof te behandelen, en in de tweede plaats is het onmogelijk, deze dan nog bovendien op hetzelfde oogenblik te bereiden. Indien men, wat voor het verkrijgen van gelijke omstandigheden een vereischte is, de beide suspensies zelf maakt, dan is het uit den aard der zaak buitengesloten, dat dit tegelijk kan geschieden. Dit nu is van zoo goed als geen beteekenis, wanneer men met stabiele suspensies als van eiwitten werkt, maar wanneer, zooals bijv. bij de bepaling van bloedvet, de te onderzoeken stof na 5 minuten reeds uitzakt, dan is alleen in het bereiden van den standaard al een groote bron van fouten aanwezig. Men is verder geheel afhankelijk van het gedrag van de standaardsuspensie gedurende het onderzoek. Waar de samenstelling van de onbekende en van de standaardoplossing wel nimmer in alle opzichten gelijk te krijgen is, daar staat men voortdurend aan het gevaar bloot, dat de standaard in een ander tempo zal uitvlokken dan de onbekende vloeistof, en dat men daardoor absoluut foutieve resultaten zal verkrijgen. Dit bezwaar is door allen, die zich met dit onderwerp hebben bezig gehouden, gevoeld, want sinds de eerste publicatie van RICHARDS is door alle onderzoekers steeds weer de nadruk

gelegd op het zoo nauwgezet mogelijk gelijk maken van alle omstandigheden voor de beide te vergelijken vloeistoffen.

Door CSONKA [1]) is echter voor het eerst met behulp van een vasten standaard, welke bestond uit het licht, dat weerkaatst werd door een met een stuk grauw papier bedekten spiegel, de onnauwkeurigheid van enkele nephelometrische methoden aangetoond aan de bepaling van cholesterine, oleine-, stearine- en palmitinezuur, waarbij hij den term *„nephelometric value" (nephelometrische waarde)* heeft voorgesteld. Onder nephelometrische waarde is volgens CSONKA te verstaan de troebeling, welke door een bepaalde hoeveelheid eener stof in een bepaalden tijd wordt veroorzaakt, vergeleken met een bepaalden standaard in den nephelometer.

Een ander bezwaar, dat uit de voorgaande onmiddellijk voortvloeit, is, dat wegens de onbetrouwbaarheid van vele standaardsuspensies het toestel slechts voor een beperkt aantal stoffen kan dienen voor het vaststellen van de eigenschappen van de colloide deeltjes.

Voor de exacte meting van de sterkte eener suspensie zoowel als voor het onderzoek naar de physisch-chemische eigenschappen ervan is het dus van essentieel belang, de beschikking te hebben over een vasten standaard, welks constante lichtsterkte photometrisch kan worden bepaald en welks waarde als een algemeen geldige maat voor de sterkte van troebele vloeistoffen kan worden aangenomen.

Bij de invoering van een vasten, constanten standaard zal het bovendien mogelijk zijn, om colloiden, welke niet of uiterst moeielijk in zuiveren toestand zijn te bereiden (zooals bijv. lecithine), en waarvan dus geen standaardoplossing kan worden gemaakt, nephelometrisch te bepalen, door ze uit te drukken in waarden van den vasten standaard.

Door verschillende onderzoekers zijn reeds vaste standaards voorgesteld.

WELLS heeft al in 1906 bij zijn onderzoekingen over zilverchloridesuspensies een vasten standaard gebruikt, welke uit een matglaasje bestond, dat op de opening van het ledige standaardproefbuisje werd gelegd. Door RICHARDS is hierop scherpe critiek uitgeoefend, omdat een vaste standaard volgens hem niet onderhevig is aan de vele wisselingen in de te onderzoeken oplossing, en omdat het bezwaarlijk gaat, het matglaasje steeds in dezelfde helling op het standaardbuisje te leggen. De laatste opmerking van RICHARDS

---

1) F. A. Csonka, J. of Biol. Chem. *34*, 577, 1918; *41*, 243, 1920.

is ongetwijfeld juist, maar in de eerste ligt eer een aanbeveling opgesloten voor het gebruik van een constanten standaard; immers wij kunnen alleen betrouwbare resultaten verwachten bij die suspensies, welke gedurende zekeren tijd, lang genoeg voor het verrichten van nauwkeurige waarnemingen, constant van samenstelling zijn; met behulp van den nephelometer met vasten standaard zal het mogelijk zijn, de voor nephelometrisch onderzoek bruikbare suspensies van de niet bruikbare te schiften.

De door CSONKA aangegeven en hierboven vermelde vaste standaard is niet aanbevelenswaardig, omdat deze standaard te ruw is en moeielijk door een geheel gelijke kan worden vervangen; algemeen geldige waarden zal men er nimmer aan kunnen ontleenen.

Een veel betere vaste standaard is het door CHÉNÉVEAU en AUDUBERT gebezigde wigvormige, neutraal getinte glas. Hiertegen valt echter aan te voeren, dat een wig niet als een fijne maat te beschouwen is, en dat alleen bij een spleetvormig veld het gevaar van ongelijkmatig belicht gezichtsveld wordt uitgeschakeld. Dat deze maat niet aan hooge eischen van nauwkeurigheid beantwoordt, blijkt overigens uit het feit, dat de aldus ingerichte nephelometer nauwkeurig is tot op 2 tot 5 %, terwijl de nephelometers van KOBER en van KLEINMAN en FEIGL een proeffout geven van ± 0,5 %.

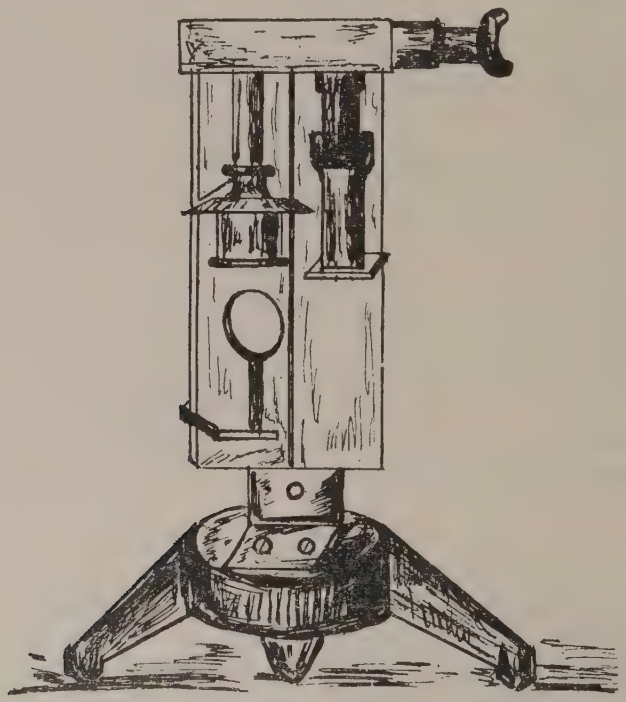


Fig. 12. De nephelometer met vasten standaard.

Bij de keuze van een vasten standaard zochten wij naar een proefinrichting, waardoor het mogelijk zou zijn, het licht van

de lichtbron willekeurig tot op een bepaalde, gewenschte sterkte te verzwakken. Als het meest aan dit doel beantwoordende kozen wij ten slotte een stel nicols, zooals ook gebruikt is voor den tyndallmeter en de daarmede gelijk staande instrumenten.

Een nephelometer met vasten standaard.

In fig. 12 is een frontale opname van den nephelometer weergegeven. In plaats van den van den waarnemer het verst verwijderden dompelaar is een cylindrische buis aan het toestel geschroefd. In deze buis zijn de beide nicols aangebracht, de onderste draaibaar ten opzichte van de bovenste. Onder de onderste van de goed gediaphragmeerde nicols is een ruimte in den cylinder, waarin plaats is voor een gekleurd glaasje. Voor ongekleurde suspensies bleek een stukje blauw, zoogen. daglichtglas van een colorimeterproefbuis van KOBER geheel dezelfde tint te geven als de te onderzoeken vloeistof. Onder de nicols is aan het statief afneembaar bevestigd een gipsspiegel, waarvan de helling een maximale weerkaatsing van het door de lichtbron uitgezonden licht naar boven in het toestel tot stand brengt.

De buis met de nicols is evenals de geheele binnenkant van den nephelometer dof zwart gelakt, behalve de schaalverdeeling op den horizontalen graadboog, die mat verzilverd is.

Resultaten.

TABÉL VIII.

0,2 % *glycogeen*oplossing; stand der nicols 5°. De verdunningen zijn bereid als bij de proeven van tabel V en VI. $S=100$.

Datum van onderzoek	10-I-'21		12-I-'21		13-I-'21		14-I-'21		
%	100	50	100	50	100	50	100	50	25
Parallel-bepalingen	98	196	98	197	97	196	98	195	385
	97	196	97	197	97	195	96	196	383
	97	199	99	197	97	195	97	195	385
	99	195	99	194	97	198	97	196	387
	97	195	97	197	98	195	99	196	390
Gemiddelde	97,6	196,2	98	196,4	97,2	195,8	97,4	195,6	386
Berekend. .		195,2		196		194,4		194,8	389,6

Uit tabel VIII kunnen wij besluiten:

1°. Het nieuwe toestel heeft een constant nulpunt.

2°. De parallelbepalingen van elke proef verschillen ± 1 %, de eindresultaten van de parallelproeven minder dan 0,5 % van het gemiddelde.

3°. De hoogten der belichte vloeistofkolommen zijn omgekeerd evenredig met de concentratie van de gesuspendeerde deeltjes ($x=\frac{s}{y}$) met een proeffout van ± 0,5 %.

4°. De nephelometer staat vergelijkingsbepalingen toe met op 1/4 verdunde suspensies, de nauwkeurigheid wordt dan echter iets geringer.

5°. Vijf parallelbepalingen zijn voldoende voor nauwkeurige resultaten.

Bij alle tot dusverre beschreven proeven hebben wij gebruik gemaakt van proefbuizen, die ten opzichte van de dompelaars betrekkelijk wijd waren. Wij hadden deze verkregen, door de door KOBER aangegeven groote proefbuizen voor zéér verdunde suspensies, welke wijder zijn dan de kleinere, tot op 4,5 c.M. lengte af te snijden. Het leek ons interessant, om na te gaan, of bij gebruik van de kleinere, nauwe proefbuizen, welker middellijn slechts 1 m.M. grooter was dan die van de dompelaars, de eenvoudige, omgekeerde evenredigheid bleef bestaan of niet, m.a.w. of de door KLEINMANN geopperde hypothese, dat KOBER's gemis aan evenredigheid het gevolg zou zijn van het gebruik van te nauwe proefbuizen [1]), juist was of niet.

TABEL IX.

0,2 % *glycogeen*oplossing, verdund als in de proeven van tabel V en VI. Stand van de nicols 5°. $S=100$.

Buizen	Waarden	100 %	80 %	70 %	60 %	50 %
Wijd	gevonden	97,6	121,8	140,4	162	196,2
	berekend		122	139,4	162,6	195,2
Nauw	gevonden	98	117	133	152,2	172,8
	berekend		122,5	140	163,4	196

[1]) Zie pagina 32.

Inderdaad blijkt uit tabel IX, dat er *bij gebruik van nauwere buizen geen omgekeerde evenredigheid* bestaat tusschen de hoogte van de belichte vloeistofkolom en de concentratie van de oplossing, zoodat de hypothese, door KLEINMANN opgesteld, juist blijkt te zijn. De formule van KOBER heeft echter bij het door ons gebouwde toestel geen geldigheid.

Tenslotte moge tabel X als voorbeeld dienen, dat ook bij andere suspensies de aflezingen bij verschillende verhoudingen aan de theoretische beantwoorden met een proeffout van ± 0,5 %, indien men althans wijde proefbuizen gebruikt.

TABEL X.

Edestine-oplossing, 0,01 %, neergeslagen en daarna verdund als bij tabel VII, wijde proefbuizen. Stand van de nicols 5°. $S=100$.

%	100	50	25
Parallel-bepalingen	91	183	366
	91	181	368
	92	181	368
	91	182	365
	91	184	363
Gemiddeld . .	91,2	182,2	366
Berekend . . .		182,4	364,8

Uit de tabellen VIII t/m X kunnen wij dus besluiten, dat de nephelometer met vasten standaard aan de daaraan te stellen eischen voldoet, mits de diameter van de proefbuizen ± 2½ m.M. grooter is dan die van de dompelaars.

Het toestel heeft een even hoogen graad van nauwkeurigheid als de beste nephelometers, doch is bovendien geschikt voor het doen van onderzoekingen naar de physisch-chemische eigenschappen van de colloide stof.

Men kan met den nieuwen nephelometer ook colloiden microchemisch bepalen, welker zuivere afzondering voor het maken van een standaardsuspensie moeielijk of ondoenlijk is, doordat men ze kan uitdrukken in waarden van het door de nicols bij een bepaalden draaiingshoek doorgelaten licht [1]). Deze waarden

[1]) De door BAUDOUIN en BÉNARD voorgestelde naam *ultraphotometer* zou dus eer voor den nephelometer met vasten standaard passen dan voor den gewonen nephelometer.

zouden met een photometer kunnen worden geijkt; voor practische, klinische doeleinden is het echter wellicht raadzaam, elken gebruikten stand van de nicols te ijken met een oplossing van chemisch zuivere glycogeen, zoodat de door een niet af te zonderen stof veroorzaakte troebeling uitgedrukt wordt in waarden van een bekende glycogeentroebeling.

De werkwijze voor stoffen, welke gemakkelijk zuiver zijn te bereiden, zou dan ongeveer de volgende kunnen zijn. Vóór de bepalingen in de onbekende vloeistof maakt men een standaardoplossing van de betreffende stof en gaat na, of de overige bestandeelen van het onbekende vocht invloed hebben op de aflezingen in den nephelometer, wanneer de uitwendige omstandigheden zooveel mogelijk dezelfde zijn (temperatuur, duur der bewerking, etc.). Alleen die suspensies — en dit geldt ook voor niet in zuiveren toestand af te zonderen verbindingen — waarbij bij gelijke uitwendige omstandigheden de overige samenstelling der te onderzoeken vloeistof geen invloed heeft op de nephelometrische aflezing bij een vasten standaard, en waarbij de gesuspendeerde stof niet merkbaar uitvlokt gedurende het onderzoek (plm. 20 minuten), zijn voor nephelometrisch onderzoek geschikt.

Door het gebruik van den vasten standaard kan men voor nephelometrische bepalingen met een hoeveelheid suspensie van slechts 10 c.c. volstaan.

SLOTBESCHOUWINGEN.

Wij hebben in Hoofdstuk IV als voorwaarden gesteld voor het verkrijgen van nauwkeurige resultaten bij het nephelometrische onderzoek, dat de aflezingen bij gelijke uitwendige omstandigheden geen wijziging ondergaan ten gevolge van de aanwezigheid van andere bestanddeelen in de onderzochte vloeistof en dat de suspensie gedurende den voor het onderzoek benoodigden tijd (plm. 20 minuten) niet merkbaar uitvlokt.

Deze voorwaarde vooropstellende kunnen wij ons gemakkelijk een oordeel vormen over de tot dusverre voorgestelde bepalingswijzen.

Ongeschikt voor nephelometrische bepalingen zijn in de eerste plaats chloor en zilver. Ook de bepaling van vetten in lichaamsvochten moeten wij na de onderzoekingen van Csonka onbetrouwbaar achten, tenzij dan volgens de door Murlin en Riche aangegeven methode, welke echter nader onderzocht dient te worden. De nephelometrische bepaling van de purinebasen en urinezuur, welke volgens Kober met denzelfden graad van nauwkeurigheid te verrichten is als de colorimetrische, staat een te korten werktijd toe (8—30 minuten), dan dat wij deze zonder nadere contrôle met den nephelometer met vasten standaard zouden kunnen aanbevelen.

Van de overige nephelometrische methoden zijn er enkele, welke zoo dikwijls gecontroleerd zijn en die zulke nauwkeurige resultaten geven, dat wij ze zonder voorbehoud als belangrijke aanwinsten voor de microchemie zouden willen kenschetsen. De bepalingen van eiwitten en proteasen, van phosphor en lecithine (als phosphor bepaald) en van calcium hebben reeds belangrijke diensten bewezen aan de physiologie zoowel als aan de pathologie. Ik noem als voorbeelden de bepaling van caseine, globuline en albumine in melk [1]), de bepalingen van eiwitten in drinkwater [1]), in cerebrospinaalvocht [2]); de verdeeling van de verschillende verbindingen van phosphorzuur in bloed over bloedlichaampjes en serum (Bloor, Feigl [3]); de vermeer-

[1]) Ph. A. Kober, J. Am. Chem. Soc. *35*, 1585, 1913.

[2]) J. A. Pfeiffer, P. A. Kober en C. W. Field, Proc. Soc. Exp. Biol. Med *12*, 133, 1915.

[3]) Bloor, Feigl, zie pag. 25 en 26.

dering van de hoeveelheid van bepaalde phosphorverbindingen in het bloed onder verschillende pathologische omstandigheden (FEIGL); het ontbreken van invloed van de calciumvoeding op het calciumgehalte van het bloed bij den mensch (DENIS en MINOT [1]), etc.

Ook de overige nephelometrische methoden, van welke ik nog met nadruk de quantitatieve bepaling van de acetonlichamen noem, zijn door hun snelheid en nauwkeurigheid toepassing en nadere bestudeering overwaard. Het steeds meer dienstbaar maken van de nephelometrie aan de bepaling van in het dierlijk en plantaardig lichaam voorkomende stoffen heeft bovendien het voordeel, dat er een tijdsparende eenheid van werken wordt verkregen, en dat door de groote ervaring, welke de onderzoeker van nephelometrische aflezingen verkrijgt, de graad van nauwkeurigheid der waarnemingen nog hooger wordt opgevoerd.

Samenvatting.

1°. Een overzicht van de tot dusverre beschreven nephelometers en van de toepassingen der nephelometrie voor de bepaling van verschillende stoffen in het dierlijk en plantaardig lichaam werd gegeven.

2°. De nephelometers van KOBER en van KLEINMANN en FEIGL werden als de meest nauwkeurige met elkaar vergeleken.

3°. Een nieuwe nephelometer, waarbij de gebreken van de sub 2°. genoemde zooveel mogelijk waren uitgeschakeld en de voordeelen van beide instrumenten waren vereenigd en waarmee dezelfde graad van nauwkeurigheid werd bereikt, werd beschreven.

4°. Kritiek werd uitgeoefend op de tot dusverre gebruikelijke nephelometers en een nephelometer met vasten standaard werd voorgesteld.

5°. Deze nephelometer heeft, evenals de sub 3°. bedoelde, een constant nulpunt, een proeffout van $\pm$ 0,5 % bij 5 parallelbepalingen en de aflezingen er mede zijn omgekeerd evenredig met de concentraties van de onderzochte suspensies; bovendien is het een geschikt toestel voor het controleeren van nephelometrische bepalingswijzen en voor het onderzoek naar de physisch-chemische eigenschappen van de colloide stof.

[1]) W. Denis en A. S. Minot, J. of Biol. Chem. *41*, 357, 1920.

6°. De eenvoudige, omgekeerde evenredigheid tusschen de concentratie van de suspensie en de hoogte van de belichte vloeistofkolom werd niet geconstateerd bij te nauwe proefbuizen; dit moet, zooals door KLEINMANN voor het eerst is verondersteld, geweten worden aan het vormen van schaduwen door den cylindrischen wand van de proefbuizen.

7°. Voor het doen van nauwkeurige bepalingen met den laatstbeschreven nephelometer is slechts ± 10 c. c. suspensie benoodigd.

8°. Als lichtbron werd aanbevolen een electrisch lampje van ± 100 kaarsen lichtsterkte met een lichtgevend oppervlak van 1 c.M^2. Deze lichtbron nadert het puntvormige licht, dat benoodigd is voor het verkrijgen van evenwijdige lichtstralen, meer dan de tot dusverre voor dit doel gebruikte.

9°. Een vloeistof werd aangegeven, waarmede men op eenvoudige wijze het glaswerk van den nephelometer kan reinigen de bruikbaarheid van deze oplossing voor het schoonmaken van ander chemisch glaswerk werd beschreven.

10°. Voorwaarden werden opgesteld, waaraan een suspensie moet beantwoorden, wil zij geschikt zijn voor nephelometrisch onderzoek.

11°. Ook colloide stoffen, welke niet of uiterst moeilijk in zuiveren toestand kunnen worden afgezonderd, kunnen in den nephelometer met vasten standaard worden bepaald.

12°. De belangrijke beteekenis van de nephelometrie voor de physiologie en de pathologie werd uiteengezet.

INHOUD.

Pag.

Inleiding 1

Hoofdstuk I. Geschiedenis der Nephelometrie 2

Hoofdstuk II. Toepassingen der Nephelometrie 22

Hoofdstuk III. Een nieuwe Nephelometer 30

Hoofdstuk IV. Een Nephelometer met vasten standaard . . 42

Slotbeschouwingen 49

STELLINGEN.

STELLINGEN.

I.

De roode bloedlichaampjes van den mensch zijn impermeabel voor glucose.

II.

De tonus van de spieren is niet de overheerschende factor bij de uitscheiding van creatinine in de urine.

III.

Men verzuime nimmer, bij psychosen, welke aan dementia paralytica doen denken, de reactie van WASSERMANN behalve in het bloedserum ook in het cerebrospinaalvocht toe te passen.

IV.

Er bestaat een overdracht van bewustzijnsinhouden buiten den gewonen, zintuigelijken weg om.

V.

Het is voor de vorming van den geneesheer van het hoogste gewicht, dat de psychopathologie als examenvak bij de practische artsexamens behouden blijft.

VI.

Een voor zeker vak afgelegd examen is geen betrouwbare maatstaf voor het al of niet geschikt zijn van de(n) geëxamineerde voor dat vak.

VII.

De syringomyelie ontwikkelt zich op den bodem van een anomale constitutie.

VIII.

De regeneratie van den Achillespees na tenotomie is toe te schrijven aan verandering van los bindweefsel in peesweefsel onder invloed van contracties van de kuitspieren (Vgl. E. REHN, Jahreskurse f. ärtzl. Fortbildung *II*, Dec. 1920).

IX.

Alvorens een hersenoperatie te verrichten, vervaardige men Röntgenfoto's na luchtinblazing volgens DANDY.

X.

De reactie van WIDAL volgens HILGERMANN is het aangewezen middel voor het opsporen van typhusbacillendragers.

XI.

Het tijdstip van de ovulatie hangt niet samen met dat der menstruatie.

XII.

Een skotoom, dat niet in verbinding staat met de blinde vlek, kan zoowel van neurogenen als van retinalen oorsprong zijn.

XIII.

De ozaena berust op een infectie met coccobacillus foetidus ozaenae Perez.

XIV.

Het is noodzakelijk, teneinde Europa zooveel mogelijk voor cholera- en pestepidemieën te vrijwaren, dat bij de stations van den Hedzjasbaan strenge quarantainemaatregelen worden getroffen.

XV.

Bij den opbouw van Palestina behoort de zorg voor de sanitaire voorziening voor te gaan boven die voor de ontginning van den bodem en die voor de organisatie van het schoolwezen.